



Université de Montréal

**Caractérisation d'une famille de récepteurs kinases  
impliqués dans le développement gamétophytique chez  
*Arabidopsis thaliana***

par

Josée Houde

Département de Sciences Biologiques

Faculté des Arts et des Sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en Sciences Biologiques

février 2010

© Josée Houde, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Caractérisation d'une famille de récepteurs kinases impliqués dans le développement  
gamétophytique chez *Arabidopsis thaliana*

présentée par :  
Josée Houde

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Mohamed Hijri, président-rapporteur  
Daniel P. Matton, directeur de recherche  
Jean-François Laliberté, membre du jury

## Résumé

Au cours du développement des végétaux, de l'établissement de l'identité cellulaire des premiers organes au guidage du tube pollinique, la communication cellule à cellule est d'une importance capitale. En réponse, les voies de signalisation moléculaires sont élaborées pour la perception d'un signal extérieur et la transduction en une réponse génique via une cascade intracellulaire. Les récepteurs kinases font partie des protéines perceptrices des stimuli et constituent chez les plantes une catégorie de protéines avec une occurrence considérable, mais dont très peu d'informations détaillées sont disponibles à ce jour. Une famille de récepteurs kinases chez *Arabidopsis thaliana*, AtORK11 (*Arabidopsis thaliana* Ovule Receptor Kinase 11), a été identifiée par orthologie à un récepteur spécifique aux ovaires chez une solanacée sauvage, *Solanum chacoense*. La fonction présumée de cette famille de récepteurs kinases de type leucine-rich repeat, suggérée par son patron d'expression, implique les événements relatifs au développement des gamétophytes et à la reproduction. Afin de caractériser la fonction des quatre gènes de la famille (*AtORK11a*, *AtORK11b*, *AtORK11c* et *AtORK11d*) une stratégie d'analyse de mutants d'insertion de l'ADN-T et d'évaluation du mode d'action par complémentation bimoléculaire par fluorescence (BiFC) a été entreprise. Aucune fonction précise n'a pu être attribuée aux doubles mutants d'insertion, par contre la surexpression d'une construction dominante négative indique un rôle dans le développement gamétophytique. Il a aussi été démontré que les quatre récepteurs peuvent interagir par homodimérisation aussi bien que par



hétérodimérisation. Une hypothèse de redondance fonctionnelle est ainsi mise à jour parmi la famille des gènes AtORK11.

**Mots-clés** : Récepteur kinase « leucine-rich repeat », transduction de signal, mutant d'insertion ADN-T, complémentation bimoléculaire par fluorescence, transformation par biolistique (bombardement de microparticules).

## Abstract

Cell to cell communication is paramount during plant developmental processes, from cellular identity in early organogenesis to pollen tube guidance. In response to this requirement, molecular cell signalling is used to perceive an external signal and transduce the response by an intracellular signalling cascade leading to specific gene activation. The sensing protein is typically a receptor kinase, which will transduce the stimulus by phosphorylation of a cytoplasmic interaction partner. Although plant receptor kinases represent the largest protein kinase family, only handfuls are well characterized. By sequence identity (orthology), a family of leucine-rich repeat receptor kinases from *Arabidopsis thaliana* was identified as AtORK11 (*Arabidopsis thaliana* Ovule Receptor Kinase 11). Based upon previous results from its ortholog in *Solanum chacoense*, the ovary-specific ScORK11 receptor kinase, we hypothesized that members of the AtORK11 receptors would be involved in gametophyte development and reproduction. In order to characterize the role of the four family members (*AtORK11a*, *AtORK11b*, *AtORK11c* and *AtORK11d*), a T-DNA insertional mutant strategy was undertaken, as well as bimolecular fluorescence complementation assays (BiFC). No precise function could be assigned to the double mutants although a dominant negative strategy revealed an involvement in gametophytic development. It was also shown that all of the receptors could form homodimers as well as heterodimers in a heterologous system, suggesting high functional redundancy for the *AtORK11* family.

**Keywords** : Leucine-rich repeat receptor kinase, signal transduction, T-DNA insertion mutant, bimolecular fluorescence complementation, tungsten microparticle bombardment.

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract .....	v
Table des matières .....	vii
Liste des tableaux .....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements .....	xv
1. Introduction .....	1
1.1 Les récepteurs kinases.....	2
1.1.1 Structure des récepteurs kinases .....	2
A. Domaine extracellulaire .....	3
B. Domaine transmembranaire.....	6
C. Domaine cytoplasmique .....	7
1.1.2 Fonctions des récepteurs kinases .....	9
1.2 Méthodes d'étude du mode d'action.....	12
1.2.1 Techniques biochimiques et autres considérations .....	13
1.2.2 Techniques en fluorescence.....	15
1.2.3 Complémentation bimoléculaire par fluorescence (BiFC).....	18
1.3 Reproduction chez les angiospermes .....	21
1.4 Contexte et description du projet de recherche .....	24

1.4.1 Objectifs de travail.....	29
2. Matériel et méthode .....	30
2.1 Matériel végétal .....	30
2.2 Vérification des homozygotes .....	31
2.3 Croisement et analyse phénotypique .....	32
2.4 RT-PCR.....	33
2.5 Analyse de la méiose .....	34
2.6 BiFC et bombardement de microparticules.....	35
3. Résultats .....	40
3.1 Récepteurs AtORK11 .....	40
3.1.1 Mutants d'insertion ADN-T .....	40
3.1.2 Doubles mutants .....	40
3.1.3 RT-PCR.....	41
3.1.4 Ségrégation anormale.....	42
3.1.5 Analyse de la méiose.....	44
3.2 Complémentation bimoléculaire par fluorescence (BiFC) .....	44
3.2.1 Constructions et planification des essais.....	45
3.2.2 Interactions entre les récepteurs kinases .....	47
3.3 Étude complémentaire de localisation subcellulaire de gènes impliqués dans la gamétogenèse et le développement.....	55
4. Discussion .....	58

4.1 Les récepteurs AtORK11 .....	58
4.1.1 Analyse phénotypique des mutants d'insertion .....	58
4.1.2 Analyse de la méiose.....	62
4.1.3 Ségrégation anormale.....	64
4.2 Étude du mode d'action par le BiFC .....	65
4.2.1 Homodimérisation.....	67
4.2.2 Hétérodimérisation.....	69
4.2.3 Contrôles négatifs .....	72
4.3 Bombardement et localisation cellulaire.....	76
5. Perspectives d'avenir .....	80
Bibliographie.....	82
Annexe 1 .....	i
Annexe 2 .....	iii
Annexe 3 .....	vi
Annexe 4 .....	vii
Annexe 5.....	viii

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1-</b> Résumé des principaux récepteurs kinases étudiés chez les plantes .....	9
<b>Tableau 2-</b> Séquences des amorces utilisées pour la construction des fusions nécessaires au BiFC.....	36
<b>Tableau 3-</b> Tableau des lignées ADN-T employées pour chacun des gènes <i>AtORK11</i> et la position de l'insertion au sein du gène.....	40

## Liste des figures

<b>Figure 1-</b> Schéma de base des domaines des récepteurs kinases .....	3
<b>Figure 2-</b> Méthodes de détection des interactions protéine-protéine <i>in vivo</i> . ....	17
<b>Figure 3-</b> Schématisation du BiFC. ....	19
<b>Figure 4-</b> Arbre phylogénétique des récepteurs kinase de type LRRIII orthologues à ScORK11.....	25
<b>Figure 5-</b> Développement des ovules dans les lignées de mutant dominant négatif d' <i>AtORK11a</i> . ....	27
<b>Figure 6-</b> Croisements des mutants d'insertion et RT-PCR des lignées ADN-T.....	43
<b>Figure 7-</b> Vecteurs du BiFC et essais planifiés .....	46
<b>Figure 8-</b> Visualisation du bombardement de cellules d'épiderme d'oignon .....	49
<b>Figure 9-</b> BiFC par bombardement de cellules d'épiderme d'oignon. Essais d'interaction pour la famille <i>AtORK11</i> .....	50
<b>Figure 10-</b> BiFC par bombardement de cellules d'épiderme d'oignon. Essais d'interaction des protéines témoins .....	53
<b>Figure 11-</b> Localisation cellulaire visualisée par fluorescence et bombardement de cellules d'oignon .....	57



## Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNg : ADN génomique

ADN-T: “T-DNA”; transferred DNA of the tumor-inducing (Ti) plasmid

AFP: auto-fluorescent protein

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

At MSrkl2: *Arabidopsis thaliana Medicago* salt-induced receptor-like kinase 1

BAK1: BRI1-associated receptor kinase 1

BAM: barely any meristem

BiFC: complementation bimoléculaire par fluorescence

BKK1: BAK1-like 1

BRET: transfert d'énergie de résonance par bioluminescence

BRI1: brassinosteroid insensitive 1

CLE: CLV3/endosperm surrounding region peptides

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

EGF: epidermal growth factor

ERL1/2: erecta-like 1/2

EST: expressed sequence tag

FLS2: flagellin sensitive 2

FRET: transfert d'énergie de résonance de Förster

GCS1: generative cell specific 1

GFP: green fluorescent protein

HAR1: hypernodulation aberrant root formation 1

IDA: inflorescence deficient in abscission

LC-MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LRR: leucine-rich repeat

MAPK: Mitogen activated protein kinase

MAP2K: Mitogen activated protein kinase kinase

MAP3K: Mitogen activated protein kinase kinase kinase

MEKK1: MAP3K MEK kinase

MS : spectrométrie de masse

NPK1: *Nicotiana* protein kinase 1

ORK: ovule receptor kinase

PCA : essais de complémentation de fragments de protéines

PEPR1: AtPep1 receptor

PRK: receptor protein kinase; protéine récepteur kinase

PRK1: pollen-specific receptor kinase 1

PSK: phytosulfokine

PSKR: phytosulfokine receptor

RKL1 : receptor kinase-like 1

RLCK: receptor-like cytoplasmic kinase; récepteur kinase cytoplasmique

RLK: receptor-like kinase; récepteur kinase

RLK902 : receptor-like kinase 902

RPK2: receptor-like protein kinase 2

RTK: récepteur tyrosine kinase

RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction

ScFRK1: *Solanum chacoense* fertilization related kinase 1

SCR/SP11: pollen S determinant

SERK: somatic embryogenesis receptor kinase

SPYCE: split-YFP C-terminal fragment expression

SPYNE: split-YFP N-terminal fragment expression

SR160: systemine receptor

SRF6/7: strubbelig receptor family 6/7

SRK: S-locus receptor-like kinase

TGF<sub>β</sub> : transforming growth factor beta

TNFR: tumor necrosis factor receptor

UTR: untranslated region

WRKY53: WRKY DNA-binding protein 53

Wt: wild-type; type sauvage

Y2H: système double hybride en levure

YFP: yellow fluorescent protein

## Remerciements

Je voudrais remercier mon directeur de recherche, Daniel P. Matton, pour m'avoir confié ce projet, pour ses conseils éclairés et pour ses poussées dans le dos. Merci d'être venu me proposer un stage au laboratoire pendant un TP de physiologie végétale.

Merci à tous les membres du laboratoire Matton qui ont aidé de près ou de loin au projet: Eric, Edith, Hugo, Faïza, Madoka, Mohammed, Mohamad, Éric, Rachid, Caroline et Audrey. Merci pour les réponses aux nombreuses questions, pour les discussions scientifiques et pour celles qui l'étaient un peu moins.

Merci à tous ceux qui créent ce si bel environnement de travail qu'est l'IRBV.

Aux nouveaux étudiants;  
n'oubliez pas que le verre est à moitié plein!

# 1. Introduction

Tout au long de leur développement, passant d'une génération à la suivante, les plantes font face à de multiples stimuli provenant à la fois du milieu intérieur et du milieu extérieur. En réponse à ces stimuli, l'élaboration de voies de signalisation moléculaire permet, entre autre, la croissance, le développement, la reproduction, la symbiose, la résistance aux pathogènes et aux stress abiotiques et, ultimement, la survie. Les voies de signalisation sont basées sur la perception d'un stimulus par un récepteur, membranaire ou non, qui enclenche une cascade menant à l'intégration de l'information. De façon classique, le signal perçu par le récepteur est relayé jusqu'au noyau par des intermédiaires intracellulaires. L'activation de facteurs de transcription au noyau, lieu de la régulation génique, mène à l'expression spécifique d'un ensemble de gènes codant pour la réponse appropriée au signal initial.

Les bases moléculaires de la réponse des plantes aux stimuli forment un domaine de recherche actif où, malgré tout, les connaissances encore limitées concernant les molécules intracellulaires restreignent l'élaboration de modèles complètement résolus pour les voies de transduction du signal. Toutefois, les connaissances sont de plus en plus élaborées au sujet des premiers joueurs de la réponse, les récepteurs, notamment dans le cas du groupe diversifié des protéines récepteurs kinases (PRK). Le premier récepteur kinase identifié fut ZmPK1, chez le maïs, en 1990 (Zhang et Walker, 1990). Grâce au séquençage du génome d'organismes modèles et aux techniques améliorées en biologie moléculaire, le nombre de récepteurs kinases caractérisés est croissant et constitue un pas d'entrée dans l'étude des voies de signalisation.

## 1.1 Les récepteurs kinases

### 1.1.1 Structure des récepteurs kinases

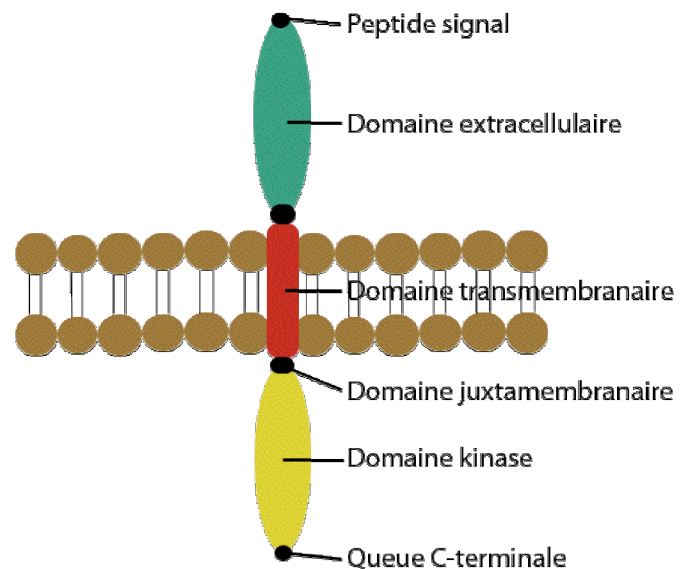
Les protéines kinases eucaryotiques se caractérisent par des domaines catalytiques procédant à la phosphorylation des résidus sérine et thréonine (Ser/Thr), des résidus tyrosine (Tyr) ou des résidus histidine (His). Cinq familles regroupent ces protéines des plantes selon leur domaine kinase, dont la famille des récepteurs kinases (RLK; «receptor-like kinase » ou PRK; « protein receptor kinases ») constitue la plus nombreuse (Chevalier et Walker, 2005). La structure même des récepteurs kinases indique un rôle dans la signalisation. Ce sont des protéines transmembranaires avec un domaine extracellulaire exposé à la surface et un domaine kinase cytoplasmique (Figure 1). Cette structure leur permet de percevoir le signal externe et de le transmettre à l'intérieur de la cellule via une cascade de signalisation ayant comme point d'origine le domaine kinase. Les récepteurs kinases des plantes sont reliés par leur structure aux récepteurs des facteurs de croissance des animaux, les RTKs (« receptor tyrosine kinase »; Walker, 1994). Toutefois, les récepteurs kinases des animaux divergent par leur domaine de liaison au ligand et par leur spécificité de type tyrosine kinase beaucoup plus répandue.

Chez *Arabidopsis thaliana*, plante modèle par excellence, 610 RLKs ont été identifiés de façon non redondante, dont 417 séquences possédant la conformation typique d'un

récepteur transmembranaire, les autres étant classés en tant que RLCK « receptor-like cytoplasmic kinase » (Shiu et Bleecker, 2001). Ce nombre constitue un pourcentage important du nombre de gènes total d'*Arabidopsis*, soit près de 2,5 %, et environ 60 % du nombre total de protéines kinases (Shiu et Bleecker, 2003). Les récepteurs kinases ont été classés en 44 familles, suivant la phylogénie de leur domaine kinase (Shiu et Bleecker, 2001). Il est aussi possible de les regrouper selon leur type de domaine extracellulaire. De fait, les récepteurs kinases ont une structure relativement conservée qui peut se caractériser selon les trois domaines décrits ci-après (Figure 1).

#### A. Domaine extracellulaire

Les domaines extracellulaires des récepteurs kinases se regroupent en 15 classes structurales : C-type lectine, CRINKLY4-like, CrRLK1-like, DUF26, extensine, L-lectine, LRK10-like, leucine-rich repeat (LRR), LysM, URK1, PERK-like, RKF3-like, S-domain, thaumatine et WAK-like (Haffani et al., 2004). Le domaine LRR est le plus fréquent, avec 216 gènes identifiés chez *Arabidopsis* et répartis



**Figure 1-** Schéma de base des domaines des récepteurs kinases membranaires

en 13 sous-familles (LRRI à LRRXIII; Shiu et Bleeker, 2001). Le motif LRR est généralement bien conservé, avec 20 à 29 résidus incluant la séquence consensus LxxLxLxxN/CxL (où x représente un acide aminé variable; Kobe et Kavaja, 2001). Selon des déductions bioinformatiques et les modèles de cristallisation effectués chez les LRR animaux, le motif crée un feuillet  $\beta$  et une hélice  $\alpha$  qui sera répété et aligné selon le nombre de LRRs, variant de 1 à 32 répétitions chez les plantes. Le rôle accordé au domaine LRR est celui de médiateur d'interaction protéine-protéine, une hypothèse principalement attribuée à sa structure architecturale (Kobe et Deisenhofer, 1994; Bella et al., 2008). Souvent, des paires de cystéines sont aussi associées aux domaines LRRs des récepteurs kinases. Bien que leur rôle précis n'ait pas été élucidé à ce jour, elles pourraient stabiliser les liaisons intramoléculaires par la formation de pont disulfure (Diévert et Clark, 2003). Le domaine extracellulaire comprend aussi un peptide signal en position N-terminale, dont l'hydrophobicité dirige la protéine vers la voie de sécrétion (Walker, 1994).

Le domaine extracellulaire des récepteurs kinase constitue la région d'interaction avec le ligand. Actuellement, les données combinées de la bioinformatique et des résultats expérimentaux ne permettent pas de prédire la nature d'un ligand selon la séquence du domaine extracellulaire. Les paires de ligand-récepteur présentement identifiées reconnaissent pour la plupart des ligands peptiques, tels que CLV3, SCR, PSK1 et la systémine, ou encore des hormones telles que les brassinostéroïdes (Butenko et al., 2009). Dans le cas de RLK impliqués dans l'interaction plante-pathogène ou dans la réponse de



défense, les signaux perçus sont des éliciteurs exogènes, tandis que pour les RLK impliqués dans le développement, les ligands ont une origine endogène (Afzal et al., 2008). Dans certains cas, une confirmation biochimique d'interaction avec le ligand a été obtenue. Des mutations du domaine extracellulaire LRR ont démontré sa fonction en tant que site de liaison au ligand pour les RLKs FLS2, CLV1 et HAR1. Par exemple, le peptide conservé de la flagelline bactérienne, flg22, doit se lier à une région restreinte à quelques LRRs au sein des 28 présents dans le domaine extracellulaire de FLS2 pour activer la réponse de défense (Dunning et al., 2007). À l'opposé, c'est plutôt une région extracellulaire non définie, nommée « Island Domain », combinée au LRR22 atypique qui est responsable de la liaison au brassinostéroïde pour le RLK BRI1 (Kinoshita et al., 2005).

Le domaine extracellulaire constitue aussi une région d'interaction pour la formation de dimères ou d'oligomères, formant les complexes de signalisation à la membrane. Par exemple, une version tronquée du RLK-LRR ERECTA, sans le domaine kinase intracellulaire, a démontré son association à d'autres récepteurs kinase par son phénotype dominant négatif et par sa migration au sein d'un complexe protéique de taille élevée (Shpak et al., 2003). Dans ce contexte, une mutation dite dominante négative peut être définie comme une mutation ou une construction tronquée dont le produit affecte négativement la version normale du produit du gène. Ceci se produit généralement lorsque la version mutante ou tronquée peut encore interagir avec la version type sauvage, bloquant certains aspects de sa fonction. Le domaine extracellulaire de SRK est aussi requis pour la

dimérisation ligand indépendante. La région d'interaction a été localisée à un domaine adoptant la structure PAN\_APPLE et à un domaine secondaire de structure semblable à EGF (Naithani et al., 2007). Le domaine extracellulaire semble ainsi responsable d'une interaction entre les récepteurs. De plus, l'implication du domaine extracellulaire et/ou transmembranaire a été prouvée pour BRI1. Ce dernier forme un homodimère, mais l'essai en double hybride avec le domaine kinase seulement ne présente pas d'interaction, illustrant la nécessité des autres domaines (Rusanova et al., 2004; Wang et al., 2005). Le récepteur BAK1 forme un complexe avec BRI1 et deux leucines extracellulaires situées dans le domaine « leucine zipper » sont entièrement ou partiellement responsables de la liaison (Yun et al., 2009). Une implication du domaine transmembranaire dans la formation d'une interaction est aussi retenue pour les récepteurs atypiques CLV2 et CORYNE. CLV2 est seulement constitué d'une région extracellulaire et transmembranaire, tandis que CORYNE comprend uniquement une région transmembranaire et un domaine kinase. L'interaction de ces deux protéines révélée par des liens génétiques est probablement effectuée par les régions transmembranaires (Muller et al., 2008). Bref, à la fois le domaine extracellulaire et le domaine transmembranaire seraient impliqués dans l'interaction des récepteurs kinases.

## **B. Domaine transmembranaire**

La partie transmembranaire des récepteurs kinase constitue un domaine typique des protéines membranaires intégrales de type I. Le passage unique à travers la membrane

plasmique est assuré par une région hydrophobe de 22 à 28 acides aminés (Walker, 1994). Cette particularité assure la localisation à la membrane plasmique des récepteurs kinases, contrairement aux récepteurs kinase cytoplasmiques (RLCK) tel que Pto-interacting1 agissant dans la voie de résistance au pathogène *Pseudomonas syringae* chez la tomate (Zhou et al., 1995).

### **C. Domaine cytoplasmique**

Le domaine en position cytoplasmique est composé de la région juxtamembranaire et du domaine kinase et il est complété par le domaine C-terminal (Figure 1). Le domaine juxtamembranaire (JM) fait le pont entre la région transmembranaire et la portion cytoplasmique. Il constitue une région de phosphorylation, comme les deux domaines à sa suite. La phosphorylation du JM a été démontrée pour au moins deux membres de la famille de récepteurs kinase SERK et pour BRI1 (Oh et al., 2000; Karlova et al., 2009). De plus, selon des analyses de délétions avec le RLK BRI1, le JM serait nécessaire à la fonction du récepteur, mais pas à son activité kinase (Wang et al., 2005).

Le domaine kinase est la région catalytique, responsable de l'activité du récepteur et de la signalisation intracellulaire. Le modèle courant propose que la liaison du ligand au récepteur induit la phosphorylation de la région cytoplasmique suite à un changement de conformation, une oligomérisation ou une stabilisation d'un dimère préformé. Ainsi, l'autophosphorylation de l'homodimère inactif SRK a été démontrée *in vitro* et *in vivo* en

réponse à la liaison du ligand SCR/SP11 (Cabrillac et al., 2001; Takayama et al., 2001). Aussi, la présence du ligand CLV3 est requise pour la formation du complexe protéique actif recruté par la phosphorylation du récepteur CLV1 (Trotochaud et al., 1999). La perception des brassinostéroïdes par BRI1 induit une phosphorylation et un changement de conformation déclenchant la dissociation de BKI1 et le recrutement de BAK1 et de d'autres substrats pour la signalisation en aval (Li et Jin, 2006).

Les récepteurs Ser/Thr sont majoritaires chez les plantes, mais certains RLKs ont une double spécificité, tel que le récepteur kinase spécifique au pollen PRK1 (Mu et al., 1994). Récemment, il a aussi été proposé, suite à des analyses de spectrométrie de masse, que la phosphorylation tyrosine spécifique serait plus fréquente que les prévisions initiales (de la Fuente van Bentem et Hirt, 2009). Par exemple, certains des résidus phosphorylés *in vivo* de SERK1 ont été identifiés par immunoprécipitation et LC-MS/MS, dont le résidu Tyr-164 (Karlova et al., 2009). Pareillement, la phosphorylation des résidus Tyr-831 et Tyr-596 a été démontrée *in vitro* et *in vivo* pour BRI1 (Oh et al., 2009).

Finalement, le domaine C-terminal constitue un site de phosphorylation et une région de régulation. Ainsi, la queue C-terminale cytosolique de BRI1 est responsable de l'auto-inhibition du récepteur jusqu'au moment du changement de conformation provoqué par la liaison du ligand (Wang et al., 2005).

**Tableau 1-** Résumé des principaux récepteurs kinases étudiés chez les plantes

Nom	Type	Ligand ( <i>famille</i> )	Rôle
BRI1	LRR	Brassinostéroïdes	Division et expansion cellulaire, différenciation, reproduction
SERK1, SERK2, SERK3 (BAK1), SERK4 (BKK1), SERK5	LRR	inconnu	Embryogenèse somatique, stérilité mâle, signalisation des BRs, réponse immunitaire innée, mort cellulaire
CLAVATA (CLV1/CLV2) CORYNE (CRN)	LRR	CLV3 ( <i>peptides CLE</i> )	Maintien du méristème apical
SRK	S-domain	SCR/SP11 ( <i>SCRL</i> )	Déterminant de l'auto-incompatibilité sporophytique
ERECTA	LRR	inconnu	Régulation pléiotropique du développement et modulateur des réponses aux stimuli de l'environnement
HAE/HSL2	LRR	IDA ( <i>IDA-like</i> )	Abscission des organes floraux
FLS2	LRR	flg22	Interaction plante-pathogène, perception de la flagelline bactérienne

### 1.1.2 Fonctions des récepteurs kinases

Étant donné leur nombre élevé, relativement peu de fonctions sont connues pour les récepteurs kinases des plantes. Par contre, selon l'information disponible, les RLKs seraient impliqués dans une grande variété de processus biologiques, bien que leur rôle précis n'ait pas été défini dans tous les cas. Les fonctions des récepteurs kinases regroupent la croissance, la régulation du développement, la perception hormonale et les interactions avec les microorganismes (Tableau 1).

Plusieurs aspects de la croissance et du développement sont contrôlés par des récepteurs kinase, dont la majorité sont des RLK-LRRs. À la suite d'analyses phénotypiques détaillées et de croisements dans divers contextes mutants, le rôle du récepteur ERECTA s'est étendu au-delà de son rôle initial dans l'élongation et la prolifération cellulaire. Les fonctions d'ERECTA rejoignent la régulation pléiotropique du développement et des processus physiologiques, de même que la modulation des réponses aux stimulations de l'environnement (van Zanten et al., 2009). Le récepteur CLAVATA1 fait partie d'une voie de signalisation responsable du maintien du méristème apical (Clark et al., 1993). Cette dernière implique aussi les récepteurs CLAVATA2 et CORYNE (Miwa et al., 2008; Muller et al., 2008). Les récepteurs HAESA et HAESA-LIKE2 participent à l'abscission des organes floraux et perçoivent les ligands peptiques IDA et IDA-LIKEs (Jinn et al., 2000; Stenvik et al., 2008). Les cinq membres de la famille SERK possèdent des fonctions différentes au cours du développement, mais agissent parfois de concert entre eux ou avec d'autres RLKs (Karlova et al., 2009). Un récepteur de type S-domain, SRK, est aussi impliqué dans les mécanismes de la reconnaissance du soi et l'établissement des barrières reproductives. Il constitue le déterminant femelle de l'auto-incompatibilité sporophytique chez *Brassica* et reconnaît le ligand peptidique SCR/SP11 (Takasaki et al., 2000; Takayama et al., 2001).

La perception hormonale implique entre autres les récepteurs kinase BRI1, PSKR et SR160. Le récepteur BRI1 perçoit les brassinostéroïdes, soit des hormones stéroïdiennes végétales. La signalisation par les brassinostéroïdes agit au cours du développement, pour réguler l'expansion et la division cellulaire, de même que la différenciation et le développement reproducteur (Li et Chory, 1997). Les récepteurs PSKR et SR160 perçoivent des hormones peptidiques, respectivement la phytosulfokine et la systémine. Le premier est impliqué dans la dédifférenciation et la redifférenciation cellulaire des cultures en suspension de certaines espèces, tandis que le deuxième répond dans la défense systémique aux herbivores chez la tomate (Matsubayashi et Sakagami, 2000; Scheer et Ryan, 2002).

Enfin, certains récepteurs kinase font partie des voies de signalisation des interactions entre les plantes et les microorganismes, tels que FLS2, PEPR1 et HAR1. FLS2 est un RLK-LRR percevant la flagelline bactérienne et activant la réponse de défense contre les pathogènes (Gomez-Gomez et Boller, 2000). PEPR1 agit aussi contre les pathogènes en activant la réponse immunitaire innée suite à la perception du peptide endogène AtPep1 (Yamaguchi et al., 2006). HAR1 représente plutôt les récepteurs kinase impliqués dans des symbioses, grâce à sa contribution dans l'élaboration des nodules racinaires chez *Lotus japonicus* (Nishimura et al., 2002).

## 1.2 Méthodes d'étude du mode d'action

La présence d'interactions est un événement clé dans les voies de signalisation. Ce peut être une interaction de phosphorylation avec la composante intracellulaire, une interaction de perception du ligand par le domaine extracellulaire, ou encore une interaction d'oligomérisation entre des récepteurs. Il est particulièrement intéressant de s'attarder au mode d'association entre différents récepteurs. À part l'évidence d'une interaction, aucun modèle d'action prédéterminé n'a été élaboré pour les récepteurs des plantes. Le mode d'action présumé des récepteurs tyrosine kinase des animaux passe par une dimérisation dépendante du ligand menant à l'activation de leur fonction kinase par phosphorylation du domaine kinase (Ulrich et Schlessinger, 1990). Les récepteurs sérine/thréonine des animaux, représentés par le récepteur kinase TGF $\alpha$ , peuvent quant à eux former des oligomères en absence du ligand. L'activation du complexe préformé se fait suite à la liaison du ligand (ten Dijke et Hill, 2004). Au départ, les récepteurs kinases des plantes ont été présumés agir de manière semblable aux récepteurs tyrosine kinase. Toutefois, des évidences variées ont démontré que les récepteurs se retrouvent à la membrane sous toutes les formes; monomère, dimère ou oligomère, dépendamment de la protéine étudiée. Ainsi, toute hypothèse sur le mode d'action d'un récepteur est possible et doit être vérifiée. Les communications requises par les différents modes d'action impliquent des interactions protéine-protéine. Afin de les étudier, plusieurs méthodes ont été mises au point, regroupant des techniques biochimiques et des techniques en fluorescence.



### **1.2.1 Techniques biochimiques et autres considérations**

Parmi les techniques biochimiques, plusieurs constituent des méthodes courantes dans les laboratoires. De façon non exhaustive, ces techniques regroupent le système double hybride en levure (Y2H), les essais de complémentation de fragments de protéines (PCA), la co-immunoprécipitation, les biopuces protéiques, la résonance plasmonique de surface (SPR), le cross-linking de protéines et la purification par affinité (Lalonde et al., 2008; Miernyk et Thelen, 2008; Morsy et al., 2008). Ces techniques combinent fréquemment la spectrométrie de masse (MS) pour l'identification des partenaires repêchés, bien que ce puisse être par analyse de l'activité enzymatique ou immunomarquage si l'identité d'une protéine est pressentie. Certaines techniques visent plutôt l'isolement de complexes protéiques, comme le Blue Native PAGE, tandis que d'autres testeront plutôt une interaction binaire, soit si une protéine s'unie avec une autre, comme le Y2H. Ces méthodes ne sont pas toutes adaptées à la recherche de partenaires d'interaction membranaires, tels que les récepteurs kinases. Par exemple, le double hybride ne convient pas car le système classique prévoit la fusion des partenaires à deux domaines d'activation d'un facteur de transcription. Lorsque l'interaction des partenaires se produit, le facteur de transcription est fonctionnellement rétabli dans le noyau (Figure 2). Une fusion à une protéine membranaire restreint le domaine du facteur de transcription en dehors de son lieu d'activité, le noyau (Xia et al., 2006). Par contre, le système mbSUS (mating-based split-ubiquitin system), développé sur le modèle du Y2H, permet la détection d'interactions membranaires. Les deux moitiés de l'ubiquitine, lorsque reconstituées par interaction des partenaires, déclenchent une action

protéase endogène spécifique et relâchent un facteur de transcription qui activera la transcription d'un gène rapporteur par diffusion dans le noyau (Figure 2; Obrdlik et al., 2004).

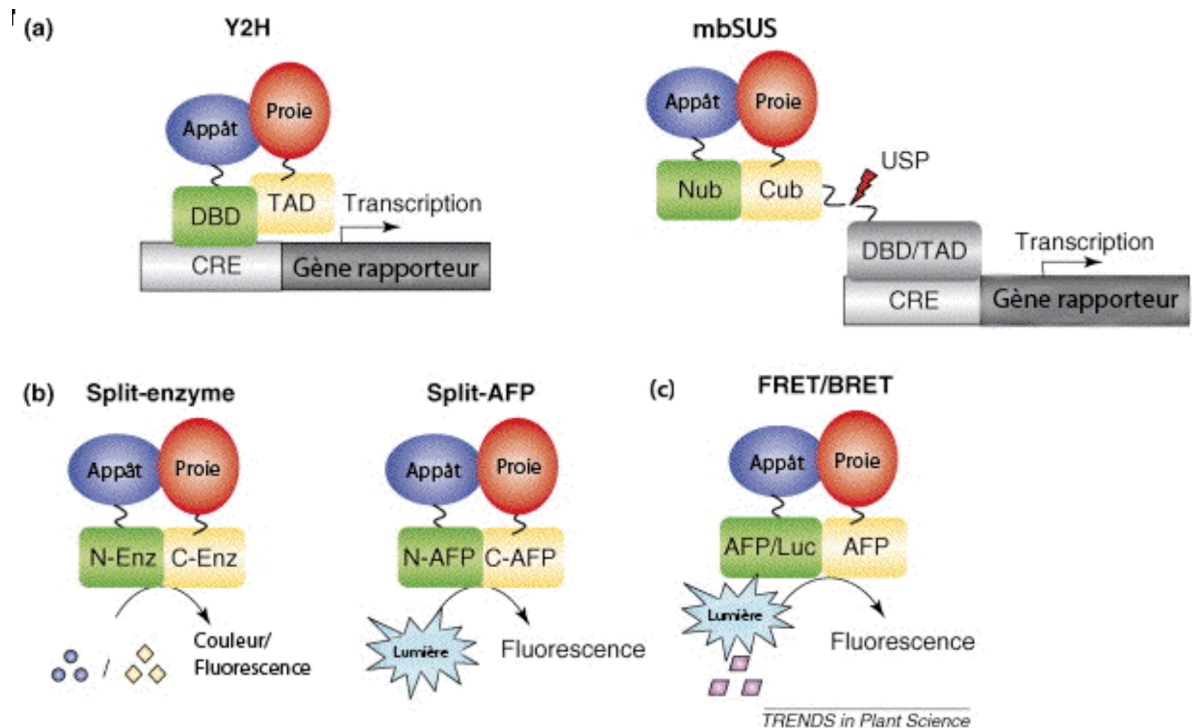
La cinétique des unions protéine-protéine varie selon la nature de celles-ci. Certaines protéines, telles que les protéines kinases ou les récepteurs de surface cellulaire, ont une interaction dynamique sollicitant une affinité de liaison plus faible, par rapport à des interactions stables qui requièrent des fortes affinités. De façon générale, les méthodes de détection diffèrent dans leur capacité à distinguer ces interactions d'affinités variables, de manière à distinguer aussi les interactions faibles ou transitoires.

Les approches *in vitro* sont facilement accessibles, informatives et permettent des essais à haut débit, par exemple le Y2H ou la purification par affinité, mais ne tiennent peu ou pas compte des lieux normaux d'interaction à l'intérieur de la cellule, contrairement aux méthodes *in vivo*. Ces dernières peuvent aussi donner des informations en temps réel. Par contre, il faut considérer le fait que dans un système hétérologue les partenaires d'interaction sont souvent en surexpression, ce qui peut refléter inadéquatement la situation native *in planta*.

### 1.2.2 Techniques en fluorescence

Ces dernières années, le nombre d'études employant des techniques de fluorescence a constamment augmenté. L'utilisation des protéines intrinsèquement fluorescentes permet entre autres des études de localisation, de trafic membranaire et d'interaction. Les fluorophores disponibles couvrent presque entièrement le spectre visible et de nombreuses variantes possèdent aussi des propriétés photochimiques ou biologiques plus appropriées à certaines applications, par exemple une sensibilité moindre au pH vacuolaire. Dans le cadre des interactions protéine-protéine, trois techniques sont particulièrement intéressantes en fluorescence. Il s'agit de la complémentation bimoléculaire par fluorescence (BiFC), du transfert d'énergie de résonance par bioluminescence (BRET) et du transfert d'énergie de résonance de Förster (FRET). Ce dernier est basé sur le transfert d'énergie d'un donneur, suite à une excitation lumineuse, vers un accepteur situé à proximité (entre 2 nm et 10 nm) et dans la bonne orientation stérique. Le donneur et l'accepteur sont des protéines fluorescentes avec des spectres d'absorption et d'émission qui se chevauchent. Ils sont fusionnés à des protéines dont l'interaction est mise à l'essai (Figure 2). Le FRET est caractérisé par l'efficacité du transfert d'énergie, évaluée par différentes méthodes visant globalement une estimation de l'intensité relative du donneur en présence et en absence de l'accepteur (Lalonde et al., 2008). Le BRET est une alternative au FRET qui ne cause pas de perte de fluorescence (« photobleaching »), de phototoxicité et de stimulation de l'autofluorescence dus à l'excitation lumineuse. En effet, le donneur du FRET est remplacé par une protéine bioluminescente, c'est-à-dire capable d'émettre de la fluorescence sans

excitation externe, par oxydation d'un substrat. Le donneur employé pour le BRET est la luciférase et l'accepteur, la YFP (« yellow fluorescent protein ») (Figure 2). Malgré ses avantages par rapport au FRET, la production lumineuse du BRET est très faible et difficile à détecter ce qui explique le nombre peu élevé d'études employant cette méthode. Toutefois, une combinaison d'une caméra très sensible, la caméra par bombardement d'électrons à dispositif de charge couplée (EB-CCD) et d'un séparateur de faisceau (Dual-View beam splitter) pour établir un ratio des émissions spécifiques au donneur et à l'accepteur, a démontré l'utilité du BRET dans des échantillons végétaux (Xu et al., 2007). Pour sa part, le BiFC constitue plutôt une technique de complémentation de fragments de protéines (PCA), telle que le mbSUS mentionnée ci-haut. Ces techniques, nommées Split-enzyme, se basent sur la fragmentation d'une enzyme en deux fragments qui seront fusionnés à des protéines d'intérêt. Si l'interaction a lieu entre ces dernières, l'activité de l'enzyme rapporteuse est reconstituée. Plutôt que de se fier à l'activité spécifique d'une enzyme, par exemple la production de couleur à partir d'un substrat chromogène, le BiFC fait appel à une propriété intrinsèque de certaines protéines; la fluorescence (protéines de type AFP, « auto-fluorescent protein »). Le BiFC fait donc partie des méthodes dites Split-AFP (Figure 2).



**Figure 2- Méthodes de détection des interactions protéine-protéine *in vivo*.** (a) Systèmes basés sur la transcription d'un gène rapporteur. Double hybride en système de levure (Y2H) : reconstitution du domaine de liaison à l'ADN (DBD) et du domaine de trans-activation (TAD) par l'interaction des protéines d'intérêt fusionnées (appât et proie). Système en split-ubiquitin (mbSUS) : clivage du facteur de transcription (DBD/TAD) par action protéase ubiquitine spécifique (USP) suite à la reconstitution des portions N-terminale (Nub) et C-terminale (Cub) de l'ubiquitine. (b) Complémentation de fragments de protéines. Split-enzyme : la reconstitution d'une enzyme scindée en deux fragments, N-terminal (N-enz) et C-terminal (C-enz), fusionnés aux protéines d'intérêt induit une coloration ou une fluorescence par action sur un substrat. Split-AFP : l'interaction des protéines d'intérêt reconstitue la protéine autofluorescente (AFP) qui émet un signal fluorescent suite à une excitation lumineuse. (c) Transfert d'énergie de résonance par bioluminescence (BRET) et transfert d'énergie de résonance de Förster (FRET). La fluorescence est émise par l'accepteur (AFP) grâce à un transfert d'énergie non-radiative d'un donneur (AFP ou Luciferase) vers l'accepteur. CRE : éléments de régulation *cis*; Ronds/losanges : substrats enzymatiques.

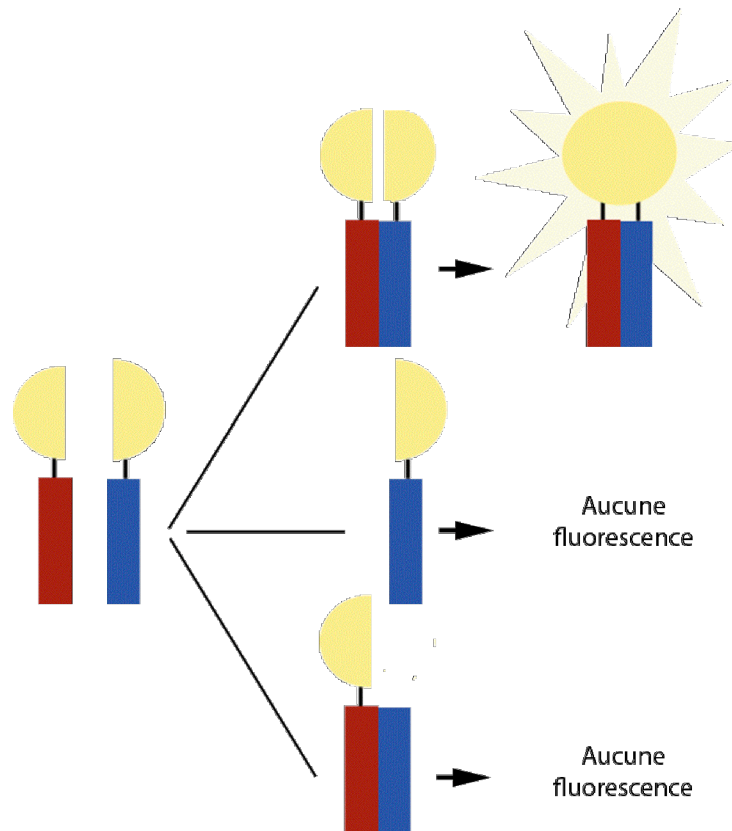
Image modifiée de Morsy et al. (2008) Charting plant interactomes : possibilities and challenges. Trends in Plant Science 13(4): 183-191.

### **1.2.3 Complémentation bimoléculaire par fluorescence (BiFC)**

La méthode du BiFC a été décrite par Hu et al. pour la première fois dans un système de cellules végétales pour un essai d'interaction entre des facteurs de transcription (Hu et al., 2002). Depuis, les exemples d'interactions démontrées par cette méthode sont nombreux et rassemblent autant des exemples d'interaction de protéines responsables des systèmes plante-pathogène que des interactions entre des récepteurs membranaires. Les caractéristiques principales du BiFC se rapportent à son irréversibilité, sa sensibilité de détection, son utilisation dans un contexte cellulaire et sa visualisation simple et directe. Effectivement, le BiFC constitue une alternative simple à d'autres techniques de détection. En théorie, les manipulations pour mener à terme une expérience en BiFC sont simples et le matériel requis est sommaire, minimalement une détection par microscopie à épifluorescence ou par cytométrie de flux.

L'irréversibilité de la méthode est une arme à double tranchant et repose sur une caractéristique de la protéine fluorescente fusionnée. Quand il y a interaction des partenaires, les fragments du fluorophore sont rapprochés et un délai très court se produit avant l'association des fragments. Une fois associés, une maturation de la conformation de la protéine fluorescente a lieu et stabilise cette dernière, rendant la dissociation improbable (Figure 3). Aucune dissociation post-fusion n'a pu être directement démontrée (Kerppola, 2006). D'un côté, cette irréversibilité permet la détection des interactions faibles et transitoires, contrairement au FRET, puisque le complexe des partenaires est stabilisé par

l'union des fragments fluorescents (Hu et al., 2002). D'un autre côté, les études dynamiques sont impossibles avec le BiFC. Il ne peut pas y avoir d'observations en temps réel d'une dynamique de formation et de dissociation d'un complexe.



**Figure 3-** Schématisation du BiFC. Les protéines d'intérêt (rouge et bleue) sont fusionnées aux fragments de l'AFP (demi-cercles jaunes). L'interaction des protéines engendre l'association des fragments et l'émission d'un signal fluorescent après maturation de l'AFP.

Une caractéristique importante sur laquelle repose le BiFC est l'absence d'association spontanée des fragments du fluorophore. À la base du concept, c'est l'interaction des protéines d'intérêts qui doit être l'unique responsable de la reconstitution de la fluorescence

(Figure 3). L'hypothèse proposée pour l'absence d'association des fragments stipule que les domaines séparés sont incapables de se replier par eux-mêmes (Magliery et al., 2005). Toutefois, selon certains auteurs, une faible proportion d'association spontanée des fragments est possible, créant un bruit de fond. Les conditions expérimentales de même que les versions du fluorophore utilisées influencent beaucoup ce facteur (Kerppola, 2006; Lalonde et al., 2008). Ainsi, il est recommandé de prévoir des témoins évaluant cette probabilité d'association naturelle des fragments. Le témoin peut être une protéine n'interagissant pas avec les partenaires, des combinaisons des fragments fluorescents avec ou sans une protéine d'interaction ou encore, une protéine mutée pour inhiber l'interaction avec sa partenaire (Kerppola, 2008; Weinthal et Tzfira, 2008). Malgré tout, plusieurs auteurs rapportent une absence de signal fluorescence en utilisant seulement les fragments non fusionnés de la protéine fluorescente, démontrant ainsi le bon fonctionnement du système (Diaz et al., 2005; Lacroix et al., 2005; Kakita et al., 2007).

D'autres contraintes au BiFC concernent les fusions des protéines avec les fragments de l'AFP. Quelques limites stériques s'appliquent à la création des fusions, telles que la position du fragment par rapport à la protéine (en amont, en aval ou au milieu), l'orientation du fragment et la présence d'une séquence de liaison (Hu et al., 2002; Kerppola, 2006). De plus, les protéines doivent supporter la fusion, c'est-à-dire voir leur fonction, ou à tout le moins, leur capacité d'interaction conservée. De plus, l'interaction stabilisée par l'association de l'AFP ne doit pas être néfaste pour la cellule.



Tel que mentionné, le BiFC détecte aussi les interactions faibles et transitoires. En outre, la détection requiert une faible concentration de protéines de fusion et peut se produire parmi une sous-population de chaque protéine. La détection n'est pas restreinte par la présence de partenaires alternatifs interagissant avec les protéines d'intérêt. De plus, une évaluation de la stoechiométrie des deux fusions est dispensable lors des expérimentations en BiFC. La détection est aussi faiblement affectée par les conditions cellulaires, un avantage par rapport au FRET (Kerppola, 2006).

Enfin, il est à noter que le signal fluorescent reflétant l'interaction est le dernier paramètre mesuré par le BiFC. De façon indirecte, le BiFC mesure, entre autres, la stabilité des fragments de l'AFP, la capacité de maturation de l'AFP par les partenaires fusionnés et l'accessibilité stérique des fragments. Ainsi, une absence d'interaction en BiFC ne prouve pas l'absence d'interaction des partenaires (Kerppola, 2008; Lalonde et al., 2008).

### **1.3 Reproduction chez les Angiospermes**

La reproduction sexuée des angiospermes vise à faire un brassage génétique, contrairement aux modes asexués de multiplication clonale. Les plantes à fleurs sont caractérisées par l'occurrence de deux générations; la génération sporophytique diploïde et la génération gamétophytique haploïde. Cette dernière est responsable de la multiplication sexuée et se

situé dans les organes reproducteurs, contenus dans la fleur. L'organe mâle, l'anthere, et l'organe femelle, l'ovaire, produisent les gamétophytes, respectivement le pollen et le sac embryonnaire. Bien qu'ayant plusieurs différences, le patron du développement gamétophytique comporte certaines ressemblances entre le mâle et la femelle. À partir d'une cellule mère initiale, il y a division méiotique pour produire quatre spores haploïdes. Une d'entre elles, ou les quatre, subiront une série de mitoses et de cellularisation pour former le grain de pollen tricellulaire et le sac embryonnaire à sept cellules (huit noyaux) contenu dans l'ovule. Suite à la gamétogenèse, la pollinisation assure le relâchement du pollen et son dépôt sur le stigmate, organe femelle de réception rattaché au style et à l'ovaire. S'ensuivent des mécanismes de reconnaissance et de rejet pour une pollinisation spécifique, puis la croissance du tube pollinique dans le style. Ce dernier transporte les gamètes mâles jusqu'au sac embryonnaire, lieu de la double fécondation. Celle-ci, caractéristique aux angiospermes, implique la fusion d'un gamète mâle et du gamète femelle et la fusion du second gamète mâle au noyau central du sac embryonnaire, formant respectivement le zygote et l'albumen. Par la suite, le développement de l'embryon, de la graine et du fruit se produisent de façon coordonnée.

À tout moment au cours des étapes de la reproduction des changements sont initiés dans les organes mâles et femelles, ou dans les tissus différents d'un même organe. La coordination dans le temps et dans l'espace est une étape cruciale du développement pour la production d'un embryon viable. Une communication au niveau moléculaire est donc requise. Les

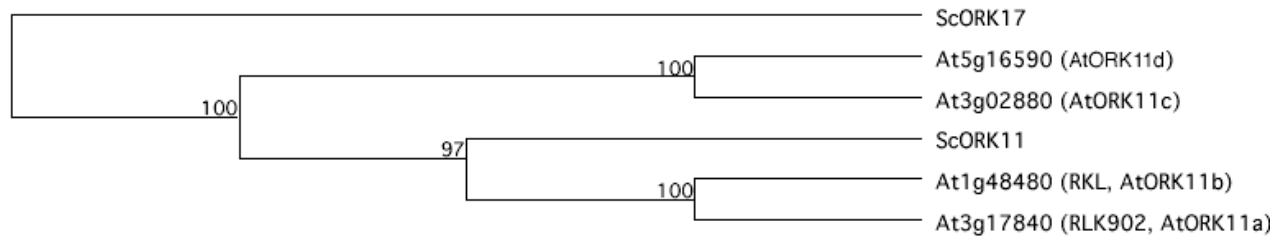
voies moléculaires impliquées dans la reproduction végétale sont partiellement caractérisées et affectent certains événements tels que le développement des organes reproducteurs, la pollinisation, la fécondation, le développement de l'embryon et le développement de la graine.

Par exemple, le récepteur SRK et son ligand SCR/SP11 sont impliqués dans l'auto-incompatibilité, un mécanisme de rejet du pollen identique à soi pour favoriser la fécondation croisée (Takasaki et al., 2000; Takayama et al., 2001). Plusieurs récepteurs kinase, tels que BAM1/BAM2, RPK2 et SERK1/SERK2 ont démontré une implication à différentes étapes dans le développement des anthères et des microspores (Albrecht et al., 2005; Hord et al., 2006; Mizuno et al., 2007). Le RLK FERONIA (FER), exprimé au niveau des synergides du sac embryonnaire, agit pour sa part dans la communication mâle-femelle au niveau de la réception du tube pollinique (Huck et al., 2003; Escaobar-Restrepo et al., 2007). Chez le mutant *fer*, les tubes polliniques sont guidés correctement au micropyle de l'ovule mais ne s'arrêtent pas et ne pénètrent pas dans l'ovule. De phénotype identique, donc fort probablement dans la même voie de signalisation, le mutant *lorelei* dont le gène code pour une protéine de type GPI (glycosylphosphatidylinositol) ancrée à la membrane, interagit probablement avec FER (Capron et al., 2008). Enfin, dans la même famille que FER, les récepteurs kinases ANXUR1 et ANXUR1 2 agissent aussi dans la communication mâle-femelle. *ANX1* et *ANX2* sont tous deux exprimés dans le pollen et, contrairement au mutant *fer* où les tubes ne cessent de croître et ne décharge pas les noyaux

spermatiques, chez le double mutant *anx1/anx2*, les tubes éclatent avant même d'arriver au micropyle (Boisson-Dernier et al., 2009; Miyazaki et al., 2009).

#### 1.4 Contexte et description du projet de recherche

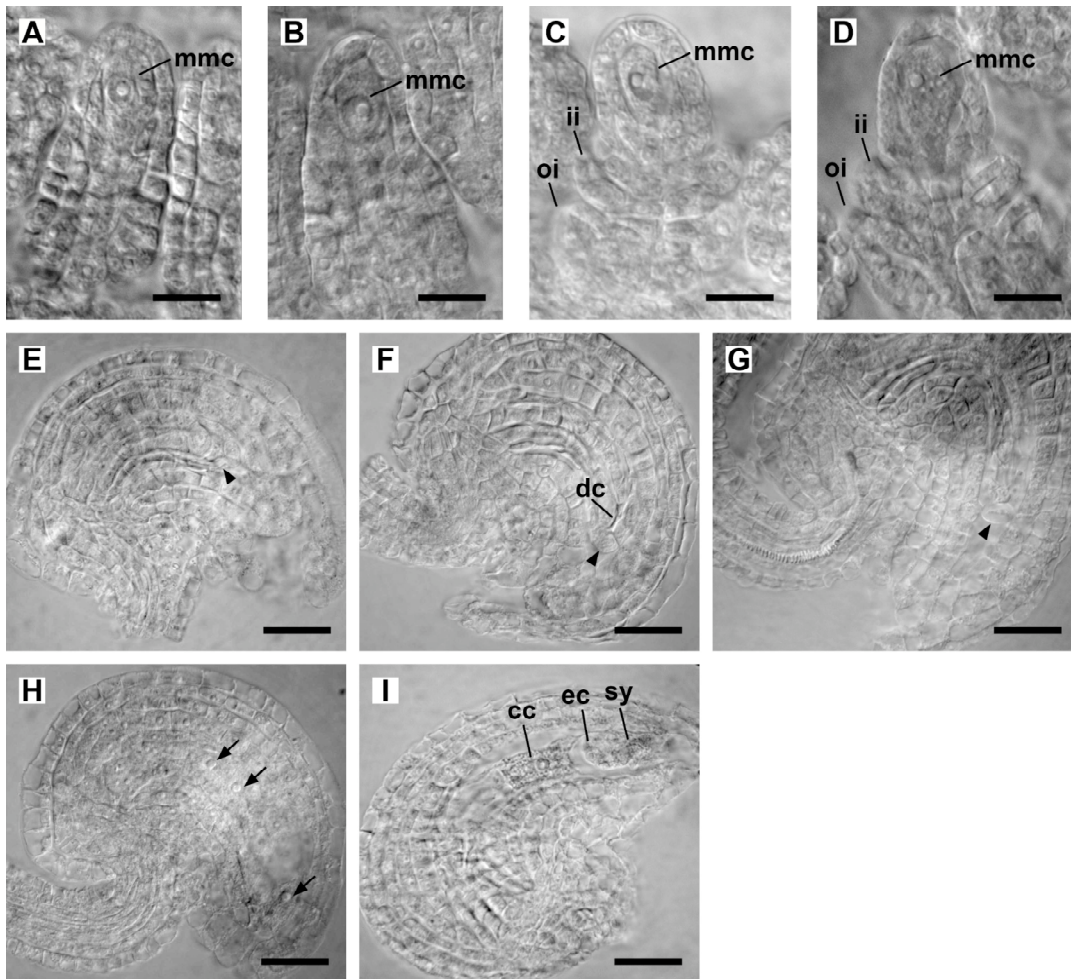
Un projet de séquençage d'EST chez *Solanum chacoense* a identifié trente récepteurs kinase impliqués dans les événements se déroulant dans les ovules lors de la fécondation (Germain et al., 2005). Parmi ceux-ci, le gène *ScORK11* a été sélectionné pour son expression prédominante dans les ovaires (*Solanum chacoense* ovule receptor kinase). Le plus proche orthologue chez *Arabidopsis thaliana* a été identifié par recherche bioinformatique en utilisant les domaines kinases de ScORK11, de RLKs d'*Arabidopsis* et de RLKs de d'autres espèces végétales. Le résultat est une famille de gènes RLK-LRRs du groupe LRRIII formant un clade avec *ScORK11*. La figure 4 présente une portion de l'arbre phylogénétique résultant, avec le récepteur kinase LRRIV ScORK17 en tant qu'extra-groupe. Le résultat de l'alignement phylogénétique est identique, qu'il soit effectué avec les séquences complètes ou en utilisant seulement les domaines kinases. La famille nommée *AtORK11* (*Arabidopsis thaliana* Ovule Receptor Kinase 11) regroupe deux paires de récepteurs, AtORK11a/AtORK11b et AtORK11c/AtORK11d, plus proche entre elles qu'avec les autres séquences analysées pour la recherche d'orthologues. La paire AtORK11a/AtORK11b se trouve plus proche de *ScORK11* que la seconde paire de récepteurs.



**Figure 4-** Arbre phylogénétique des récepteurs kinase de type LRRIII orthologues à ScORK11. Les nombres indiqués aux nœuds représentent les valeurs de «bootstrap » (figure tirée de Gray-Mitsumune et al., en préparation).

Les quatre récepteurs kinase identifiés sont des RLKs de structure typique contenant cinq domaines LRRs, tel qu'annoté par les logiciels de prédiction. Certaines analyses ont déjà été effectuées sur la famille des gènes *AtORK11*, notamment sur l'étude du patron d'expression et sur l'analyse du mutant dominant négatif pour *AtORK11a* (Gray-Mitsumune et al., en préparation). Tel qu'évalué par RT-PCR, les gènes *AtORK11* possèdent des patrons d'expression différents, mais tous sont exprimés dans les tissus reproductifs. *AtORK11a* possède le patron le plus restreint, avec une forte expression dans les siliques en développement. L'expression d'*AtORK11b* est semblable en ce sens qu'il est plus fortement exprimé dans les tissus reproductifs (fleurs et siliques) que dans les tissus végétatifs (tige, feuilles caulines, rosette et racines). Les gènes *AtORK11c* et *AtORK11d* ont des patrons comparables entre eux, avec une expression plus ubiquitaire et plus abondante. *AtORK11c* est aussi fortement exprimé dans les racines. Les lignées de mutants dominant

négatif surexpriment une version tronquée du récepteur AtORK11a, c'est-à-dire la protéine sans son domaine kinase. Le phénotype démontre une semi-stérilité révélée par des siliques courtes et un nombre réduit de graines par silique. Un problème de létalité du pollen a aussi été retrouvé, apparaissant après la formation des microspores. Plus encore, une inhibition du développement du sac embryonnaire se produit dans les lignées mutantes, présentant des ovules avortés dont l'absence du sac embryonnaire est remplacée par une structure en dégénérescence (figure 5).



**Figure 5- Développement des ovules dans les lignées de mutant dominant négatif d’*AtORK11a*.** Les images montrent des ovules de type sauvage (A, C, H et I) et du dominant négatif d’*AtORK11a* (B, D, E-G) observés en contraste différentiel d’interférence (DIC). Les premiers stades de développement sont semblables (A-D), mais à partir du stade 3 (selon la classification de Schneitz et al., 1995) les lignées du dominant négatif d’*AtORK11a* présentent des ovules avortés, soit des ovules sans sac embryonnaire mais avec des téguments se développant normalement (E-G). Au contraire, les ovules des plants de type sauvage présentent des ovules normalement développés lorsque observés aux mêmes stades que les ovules mutants (H, I). cc, cellule centrale; dc, cellule dégénérée; ec,

cellule œuf; ii, tégument interne; mmc, cellule mère des mégaspores; oi, tégument externe; sy, synergide, les barres d'échelle représentent 20  $\mu\text{m}$  (figure tirée de Gray-Mitsumune et al., en préparation).

De plus, le groupe de Tarutani et collaborateurs avaient précédemment identifiés *AtORK11a* et *AtORK11b* comme les gènes *RLK902* et *RKLI*, respectivement (Tarutani et al., 2004a). Par analyse de Northern, la présence des deux gènes a été retrouvée en plus forte expression dans les inflorescences et en faible expression dans les autres tissus végétatifs, ce qui correspond aux expériences mentionnées ci-haut. Des analyses avec le gène rapporteur *GUS* exprimé sous le promoteur natif des deux gènes a révélé la présence concomitante d'*AtORK11a* et d'*AtORK11b* dans la zone d'abscission florale et dans le tissu vasculaire racinaire. *AtORK11a* est aussi exprimé dans l'apex des racines et des racines latérales et dans les stipules, tandis qu'*AtORK11b* est aussi localisé dans les trichomes, les hydathodes et à l'apex des filaments des anthères (Tarutani et al., 2004a). L'activité kinase des deux récepteurs a aussi été étudiée, prouvant qu'*AtORK11a* et *AtORK11b* sont capables d'autophosphorylation et constituent donc des protéines kinases fonctionnelles (Tarutani et al., 2004b). Par criblage en système double-hybride, trois protéines de fonction inconnue ont été repêchées pour une interaction avec les domaines kinases d'*AtORK11a* et d'*AtORK11b* (Y1 At5g05190, Y2 At3g27210, Y3 At3g17950). Bien que le patron d'expression de ces protéines ne soit pas identique à celui des deux récepteurs, ce résultat peut indiquer que des composantes de la voie de signalisation sont partagées entre les deux récepteurs.



#### 1.4.1 Objectifs de travail

En continuité avec ces données recueillies sur la famille des gènes *AtORK11a*, le projet de recherche entrepris visait, dans son objectif général, à poursuivre la caractérisation des récepteurs kinases. Cet objectif comportait deux volets : une caractérisation de la fonction des récepteurs kinases par analyse phénotypique et une évaluation de leur mode d'action. Premièrement, la création de mutants d'insertion ADN-T multiples ambitionnait à assigner une fonction aux récepteurs, par l'occurrence d'un phénotype attribuable aux gènes abolis. Des phénotypes au niveau de la reproduction étaient recherchés, en accord avec le mutant dominant négatif créé pour *AtORK11a* et selon les analyses d'expression des quatre gènes. Une hypothèse à tester concernait la possibilité d'une redondance fonctionnelle au sein du groupe *AtORK11*. Deuxièmement, l'étude du mode d'action des récepteurs était à évaluer en utilisant le BiFC et la technique d'expression transitoire par la biolostique, soit le bombardement de cellules avec des microparticules de tungstène enrobées d'un vecteur plasmidique pouvant exprimer les protéines à l'étude. Les capacités d'homodimérisation et d'hétérodimérisation des récepteurs *AtORK11* étaient donc mises à l'épreuve. La méthode du BiFC devait être optimisée en premier lieu, de façon à servir aussi pour des analyses de localisation subcellulaire dans d'autres projets du laboratoire. Par exemple, pour la localisation du récepteur kinase *ScORK28* à la membrane plasmique (Germain et al., 2007).

## 2. Matériel et méthode

### 2.1 Matériel végétal

Pour la croissance d'*Arabidopsis thaliana* écotype columbia, les paramètres suivants ont été suivis. Les graines sont stérilisées en traitant environ 25 graines à la fois avec 500 µl d'éthanol 70 % et 0,05 % de Tween 20 pendant 5 minutes, suivi de trois lavages à l'éthanol 100 % puis d'un séchage complet sous la hotte à flux laminaire. Les graines sont ensuite disposées sur des pétris \_ MS (\_X sels Murashig et Skoog (MS), 1X vitamines MS, 20 g/L saccharose, 6 g/L agar, pH 5,8). La stratification est réalisée en plaçant les pétris à 4 °C au noir pendant 2 à 4 jours. Les pétris ensemencés sont transférés en chambre de culture *in vitro* (22 °C, 16 heures d'illumination) pour une durée de 7 à 10 jours. Les plantules sont alors assez développées pour être transférées en terre. Pour cette étape, le système Arasystem (BetaTech) est utilisé, où chaque plant est dans un pot individuel dans un mélange de terre noire, de tourbe et de perlite passé à l'autoclave. Les plantes sont placées en chambre de croissance à 21 °C, 65 % d'humidité et sous une illumination de 16 heures à 158 µmol d'intensité lumineuse (ATC60, Conviron). L'arrosage est effectué deux fois par semaine, avec de l'engrais 20-20-20 (0,5 g/L) une fois sur deux.

Les lignées de mutants d'insertion ADN-T pour *Arabidopsis thaliana* proviennent des banques NASC ou ABRC (Alonso et al., 2003). Pour chacun des gènes à l'étude, les lignées suivantes sont analysées: *AtORK11a*, GABI\_114B09; *AtORK11b*, SALK\_099094;

*AtORK11c*, SALK\_019840; *AtORK11d*, SALK\_053366. Les positions des ADN-T ont été séquencées pour vérification du site d'insertion du ADN-T à l'IRIC (Institut de recherche en immunologie et oncologie, Montréal).

## 2.2 Vérification des homozygotes

Les lignées ADN-T sont vérifiées par un criblage PCR. Les plants à cribler sont mis en chambre de croissance jusqu'à ce que les deux premières feuilles apparaissent, suite aux cotylédons. Ces deux feuilles sont récoltées et congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Elles constituent le matériel pour l'extraction d'ADN génomique suivant le protocole modifié d'Edwards (Edwards et al., 1991). Les tissus congelés sont broyés directement dans un microtube de 1,5 ml avec un pilon de plastique refroidi dans la glace sèche. L'ADN génomique extrait est resuspendu dans 50  $\mu\text{l}$  de TE pH 8.0 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) et directement utilisé pour le PCR, à raison de 1  $\mu\text{l}$  à 2  $\mu\text{l}$  par réaction.

La réaction PCR utilise 0,625 unités de Crimson TAQ (New England BioLabs), 5X Crimson TAQ buffer, 0,2 mM dNTPs, 0,2  $\mu\text{M}$  de chaque amorce, 3,2 % DMSO et 1  $\mu\text{l}$  ADNg dans un volume de 25  $\mu\text{l}$ . Le cycle d'amplification (95  $^{\circ}\text{C}$  3 min.; 42X [95  $^{\circ}\text{C}$  25 sec., 55  $^{\circ}\text{C}$  20 sec., 68  $^{\circ}\text{C}$  1 min.]; 68  $^{\circ}\text{C}$  5 min.; 4 $^{\circ}\text{C}$   $\infty$ ) est effectué avec le thermocycleur GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems). Les amorces utilisées sont une combinaison d'amorces spécifiques au gène (P1P2) pour amplifier le fragment de gène et

une combinaison d'une amorce spécifique au gène et d'une amorce spécifique à l'insertion ADN-T (P2LB) (voir le schéma explicatif à l'annexe 4). L'amorce spécifique à la bordure du ADN-T est LBmgm 5'CCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAA 3' (pour les lignées SALK\_019840, SALK\_053366 et SALK\_099094) ou GabiRB 5'CGACGGATCGTAATTTGTCGTTTTTA 3' (pour GABI\_114B09). Les amorces spécifiques aux gènes sont : GABI\_114B09 (AtORK11a) P1 AtMF 5'TGTCTACATTTGGATCCAGCC 3', P2 AtMR 5'CAAGACCCACTGAGCTCTCAC 3'; SALK\_099094 (AtORK11b) P1 AtGF1 : 5'TGCTCTCTCTGGCTCACTCCCTA 3', P2 AtGR1 5'CAAACGTTCCCTTTCCCAAGAACC 3'; SALK\_019840 (AtORK11c) P1 AtKF 5'TAAACGGGTCTATTCCGAGTTCGTT 3', P2 AtKR 5'AAACCAGGTCCATCAAGATCACAAA 3'; SALK\_053366 (AtORK11d) P1 AtLF2 5'GCCGAAATAAAACGTTGGTC 3', P2 AtLR2 5'AATCCTTTACAACAGTGAACGC 3'.

### 2.3 Croisement et analyse phénotypique

Cinq à dix plantes homozygotes pour chaque génotype d'insertion ADN-T sont sélectionnées après environ 4 semaines de croissance en terre, ou lorsque l'inflorescence atteint une dizaine de centimètres et que 3 à 6 siliques sont produites. Le croisement se fait en deux étapes, émasculatation et pollinisation, tel que décrit en détail dans l'annexe 1. La croissance des plantes croisées se poursuit dans les chambres de croissance, jusqu'à ce que

la silique provenant du croisement puisse être récoltée, soit environ deux semaines. Les graines de cette silique constituent la F1 qui est mise en terre, puis vérifiée pour l'hétérozygotie par criblage PCR. Les graines issues de cette F1, soit la F2, sont mises en terre et les plantes sont criblées par PCR pour l'obtention d'un mutant double homozygote.

Le phénotype de la F3 double homozygote telle que sélectionnée est analysé en fonction de la germination sur le milieu \_ MS, la croissance générale de la plante (apparence et nombre des feuilles, tiges et embranchements), le moment de floraison et la quantité de graines produites par silique.

## **2.4 RT-PCR**

Pour chaque lignée ADN-T, les feuilles de la rosette d'une plante simple homozygote vérifiée par PCR ont été récoltées et congelées à -80 °C. L'extraction au trizol (TRIzol Reagent, Invitrogen) de l'ARN de ces tissus a été effectuée selon le protocole du manufacturier. Après quantification au spectrophotomètre et vérification de la qualité par gel d'électrophorèse (1 % agarose, 500 ng/puit), 1 µg d'ARN totaux de chaque échantillon est utilisé pour la réaction de transcription inverse avec la M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) selon le protocole du fabricant. La réaction finale est traitée avec 2,5 unités de RNase H à 37 °C pour 20 minutes.

L'ADNc obtenu est utilisé pour le PCR à raison de 2 µl par réaction de 50 µl. La réaction PCR utilise 0,25 unités de Crimson TAQ, 5X Crimson Taq buffer, 0,2 mM dNTPs et 0,2 µM de chaque amorce, avec un cycle d'amplification de 95 °C 3 min.; 40X [95 °C 25 sec., 55 °C 20 sec., 68 °C 1 min.]; 68 °C 5 min.; 4°C ∞). Les amorces utilisées sont les suivantes : GABI\_114B09 (AtORK11a) AtMF2 5'CCCGATCTGCACCCGATTG 3', AtMR; SALK\_099094 (AtORK11b) AtGF1, AtGR1; SALK\_019840 (AtORK11c) AtKF, AtKR2 5'AAGCTTCCTTTAGACATGTACTCAAAGACA 3'; SALK\_053366 (AtORK11d) AtLF3 5'TGTGGGTTTATCGGGTCCATTAC 3', AtLR3 5'CAAGAAAAGCACGAGAAGCAAGAC 3'. Les amorces ActF 5'ATAACCATCGGAGCTGAGAGATTCC 3' et ActR 5'TTGAAATCCACATCTGTTGGAAGGT 3' servent de contrôle.

## 2.5 Analyse de la méiose

Les graines de la F2 ou de la F3 des lignées dominants négatifs ND3 et NF7 (créés par Madoka Gray-Mitsumune) ont été mises sur milieu \_ MS pour la germination avant le transfert en terre et en chambre de croissance jusqu'à l'obtention de siliques et d'inflorescences. Les plants numérotés individuellement sont issus des graines des plants ND372, ND375 et NF71. Le nombre de graines par silique a été compté pour chacun des plants pour vérifier que le phénotype est conservé dans cette génération suivante. Les inflorescences ont été récoltées et fixées au FAA (50 % éthanol : formalin : acide acétique

[90 : 2 : 5]) toute la nuit à la température pièce. La fixation est suivie d'un lavage rapide à l'éthanol 95 % puis d'un lavage à l'éthanol 70 % avant la conservation à 4 °C dans l'éthanol 70 %. Les inflorescences sont ensuite traitées pour la coloration de Feulgen selon le protocole décrit par Barrell et Grossniklaus en les incubant toute la nuit dans le réactif de Schiff et en les immergeant en dernier lieu dans un mélange de 50 % d'huile à immersion (Immersol 518 F, Zeiss) et de 50 % d'éthanol (Barrell et Grossniklaus, 2005). Les dissections sont effectuées au binoculaire SteREO Discovery.V12 (Zeiss) en utilisant des seringues à insuline ou un fil de métal monté sur un petit manche, pour ensuite faire les observations au microscope confocal (Meta 510 LSM, Zeiss) avec une excitation de 488 nm et une détection de l'émission entre 640 nm et 740 nm.

## **2.6 BiFC et bombardement de microparticules**

Les vecteurs d'expression pour le BiFC en provenance du laboratoire de Jörg Kudla (Walter et al., 2004) ont été obtenus par l'entremise de Chantal Beauchemin, du laboratoire de Jean-François Laliberté à l'INRS-Institut Armand-Frappier et Patrick Gulick, de l'Université Concordia. Les constructions des gènes d'intérêts avec ces vecteurs sont réalisées par clonage Gateway (Invitrogen). Les gènes complets sont amplifiés à partir de l'ADNc avec les amorces inscrites dans le tableau 2.

**Tableau 2-** Séquences des amorces utilisées pour la construction des fusions nécessaires au BiFC.

Gène	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce
<i>AtORK11a</i>	gwAt3g17840_F	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGCGACTCTTCTTCACACCG 3'
	gwAt3g17840_R	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCC CCACCCGATCTGCACC 3'
<i>AtORK11b</i>	gwAt1g48480_F	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGCGAGTCTTCTTCTTCCCC 3'
	gwAt1g48480_R	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAT CAGCTTCGTTCACTTGGTCTGA 3'
<i>AtORK11c</i>	gwAt3g02880_F	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGAAGTATAAGCGTAAGCTAAGTC 3'
	gwAt3g02880_R	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGT CGGATACAGGATTTGGG 3'
<i>AtORK11d</i>	gwAt5g16590_F	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGAAGAACAAGACCAATTTAGGT 3'
	gwAt5g16590_R	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAT CGGACAAAGGACCTGGTGA 3'
<i>Atlg27190</i>	atlg27190attB1	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGAAGAAGATCTTCATCACACTC 3'



	at1g27190attB2	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCA GCTTCTTGTTTGTGAAGACC 3'
<i>AtSERK1</i>	AtSERK1attB1	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGAGTCGAGTTATGTGGTG 3'
	AtSERK1attB2	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCC TTGGACCAGATAACTCAAC 3'

Le gène ScFRK1 est amplifié avec les amorces suivantes à partir du produit du sous-clonage de l'insert complet de ScFRK1 dans pBluescript II SK+ (Stratagene) : ScFRK1attB1 5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCTGAAATTGTTCT 3' , S c F R K 1 a t t B 2 5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAACCAAATGACG 3' (sous-clonage effectué par Edith Lafleur). Les inserts sont introduits dans le vecteur d'entrée pDONR/ZEO (Invitrogen) avant d'être transférés au vecteur de destination, soit Gw-pUC-SPYNE, Gw-pUC-SPYCE ou pMDC83 selon le cas (Walter et al., 2004; Curtis et Grossniklaus, 2003). Si nécessaire, les fusions sont séquencées avec les amorces NosR 5'AACTTTATTGCCAAATGTTTGAACGA 3', 35S 5' GGAAGTTCATTTCAATTGGA 3', SpyneR 5' GAACTTCAGGGTCAGCTTGC 3' ou SpyceR 5' AGTTCACCTTGATGCCGTTTC 3'. La vérification de la séquence complète d'At1g27190 a été faite en utilisant aussi At1g27190\_705F 5' TTTGTGGGAAGCCTTTATCG 3' et At1g27190\_1791R 5'

CTGAATCATCGTTGGCCTTT 3'. La vérification d'*AtSERK1* (At1g71830) a été complétée en utilisant aussi l'amorce AtSERK1\_F1114 5'GGGTATGGTATAACTGGAGCAATA 3'.

Ces vecteurs sont amplifiés dans une souche bactérienne et une maxipréparation est effectuée selon le protocole proposé par Sambrook en utilisant la lyse alcaline et la purification au polyéthylène glycol (Sambrook et al., 1989, p 1.33). La resuspension finale de l'extraction dans le TE pH 8.0 est d'un volume de 50 µl à 100 µl, pour obtenir une concentration finale entre 1 et 5 µg/µl d'ADN plasmidique.

La transfection des vecteurs pour l'essai en BiFC se fait par bombardement de microparticules de tungstène et l'échantillon végétal est l'oignon jaune (*Allium cepa*). Ceux-ci sont des oignons biologiques achetés au marché ou les oignons (oignons Sturon #o278, William Dam Seeds) cultivés à cette fin dans les serres de recherche de l'IRBV au Jardin Botanique de Montréal. Le bombardement, expliqué en détail dans l'annexe 2, consiste en la préparation des billes de tungstène recouvertes d'ADN plasmidique et du bombardement sur l'échantillon à l'aide d'un appareil maison calqué sur le système PDS-1000 à l'hélium (BioRad). Les observations microscopiques sont effectuées avec un microscope à épifluorescence AxioImager.M1 (Zeiss) à l'aide des filtres 46 (YFP; exc. BP500/20, em. BP535/30) et 38 (GFP; exc. BP470/40, em. BP525/50).

## 3. Résultats

### 3.1 Récepteurs AtORK11

#### 3.1.1 Mutants d'insertion ADN-T

Par similarité de séquence, les quatre gènes *AtORK11* d'*Arabidopsis thaliana* ont été auparavant identifiés comme des orthologues de *ScORK11*, un récepteur kinase exprimé dans les ovaires chez *Solanum chacoense* (Germain et al., 2005). Ces gènes ont été nommés *AtORK11a* (At3g17840), *AtORK11b* (At1g48480), *AtORK11c* (At3g2880) et *AtORK11d* (At5g16590). Afin de caractériser leur fonction, l'analyse de mutants d'insertion ADN-T a été entreprise. Pour chacun des gènes, les lignées de mutants d'insertion disponibles à ce moment dans les banques communes ABRC ou NASC ont été obtenues par le biais du répertoire « T-DNA Signal Express ». Il est à noter qu'aucune nouvelle lignée d'insertion ADN-T n'a été offerte par la suite dans l'une de ces banques. Ces plantes devaient fournir des lignées « knock-out » pour les gènes d'intérêt, dues à l'insertion du transgène dans la partie codante du gène. Ces quatre lignées ADN-T d'*Arabidopsis thaliana* écotype Columbia sont nommées B09 (GABI\_114B09; *AtORK11a*), 094 (SALK\_099094; *AtORK11b*), 840 (SALK\_019840; *AtORK11c*) et 366 (SALK\_053366; *AtORK11d*). Pour chacune des lignées, le séquençage du fragment obtenu par le PCR combinant l'amorce spécifique au gène et l'amorce de la bordure de l'ADN-T a permis d'établir la position de l'ADN-T à l'intérieur du gène (Tableau 3). L'ADN-T se retrouve au sein du premier exon

pour les gènes *AtORK11b* et *AtORK11c*, tandis qu'il est dans la région du 3'UTR pour le gène *AtORK11a* et dans le promoteur pour *AtORK11d* (Tableau 3).

**Tableau 3-** Tableau des lignées ADN-T employées pour chacun des gènes AtORK11 et la position de l'insertion au sein du gène.

Nom	Gène	Lignée ADN-T	Position
<i>AtORK11a</i>	At3g17840	GABI_114B09	3' UTR
<i>AtORK11b</i>	At1g48480	SALK_099094	Exon
<i>AtORK11c</i>	At3g02880	SALK_019840	Exon
<i>AtORK11d</i>	At5g16590	SALK_053366	Promoteur

### 3.1.2 Doubles mutants

Le phénotype des simples homozygotes au niveau de la morphologie générale et de la quantité de graines produites par siliques s'étant révélé identique au type sauvage, les croisements ont été effectués pour obtenir les doubles mutants. Ainsi, les lignées simples homozygotes vérifiées ont été croisées entre elles pour parvenir aux six combinaisons possibles de doubles mutants (Figure 6). Une fois l'homozygotie des doubles mutants établie, le phénotype a été évalué en fonction de la germination sur le milieu \_ MS, la croissance générale de la plante (apparence et nombre des feuilles, tiges et ramifications), le moment de floraison et la quantité de graines produites par silique (Annexe 3). L'ensemble des doubles mutants présente un phénotype semblable au type sauvage. Il est impossible de

discerner une différence dans les caractères généraux de croissance, soit la morphologie, entre les mutants et le contrôle. De plus, le décompte du nombre de graines par silique ne présente pas de variation par rapport au type sauvage (Annexe 3).

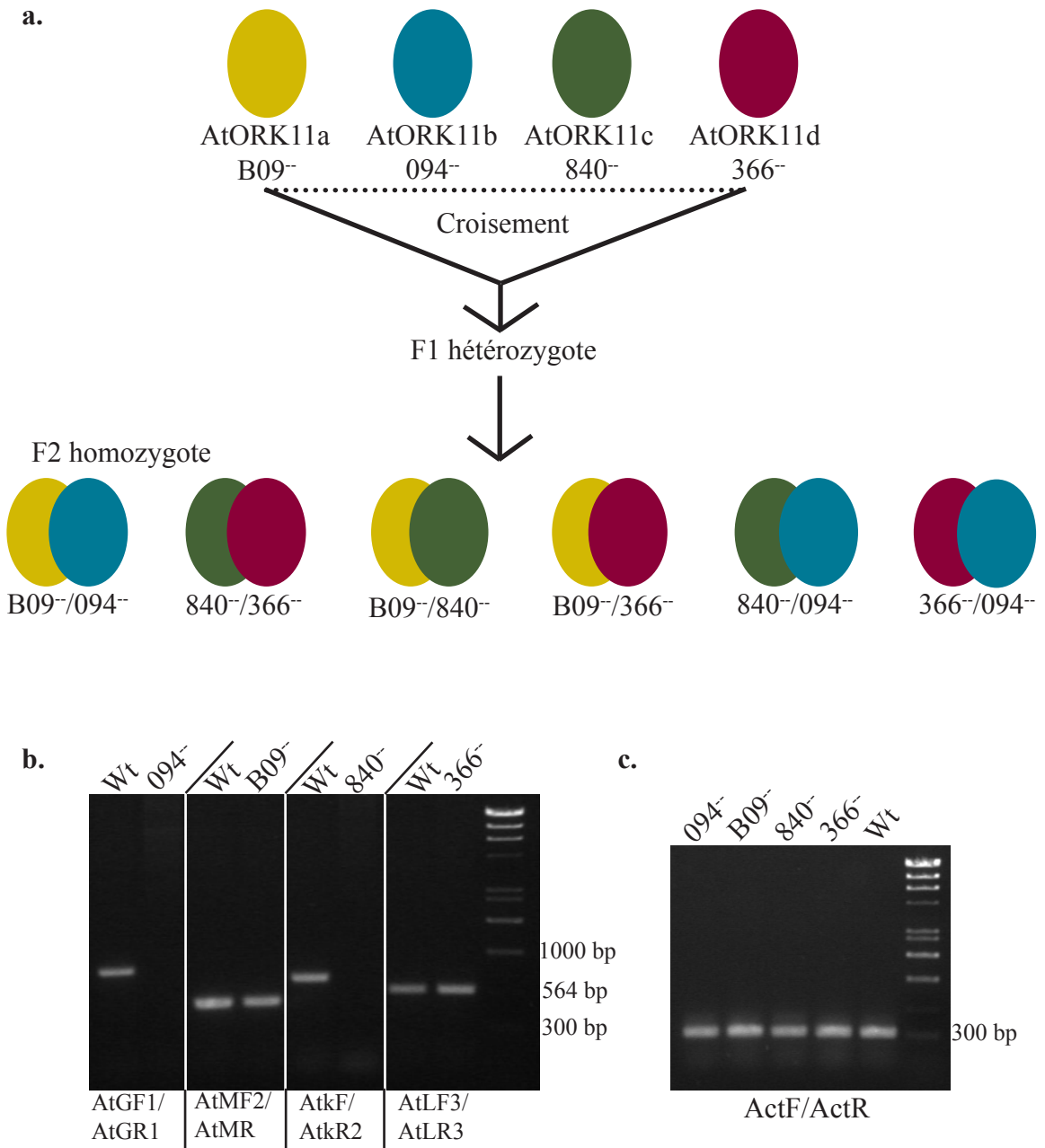
### 3.1.3 RT-PCR

Avec l'intention de vérifier l'expression des gènes des lignées ADN-T utilisées, un RT-PCR a été fait sur les tissus simples homozygotes pour l'insertion. Les feuilles de la rosette ont été choisies, car c'est le tissu le plus accessible où l'expression normale des quatre gènes est relativement semblable, selon le RT-PCR effectué par Madoka Gray-Mitsumune. Le résultat obtenu est une absence d'expression des gènes *AtORK11b* et *AtORK11c* dans les mutants 094<sup>-</sup> et 840<sup>-</sup> respectivement, tel qu'observé par l'absence de fragment pour les mutants contrairement au contrôle de type sauvage (Figure 6b). Ce résultat était attendu puisque dans les mutants d'insertion disponibles, l'ADN-T interrompait la région codante du gène. Pour les gènes *AtORK11a* et *AtORK11d*, soit les mutants B09<sup>-</sup> et 366<sup>-</sup>, il y a production d'un fragment de façon identique au contrôle (Wt) (Figure 6b). Ce RT-PCR n'étant pas quantitatif, l'expression détectée pour les gènes *AtORK11a* et *AtORK11d* ne peut être qualifiée de réduite ou diminuée. Le RT-PCR pour les gènes *AtORK11a* et *AtORK11d* ne permet pas de discriminer entre des lignées « knock-down » ou intactes. Les fragments obtenus pour B09<sup>-</sup> et 366<sup>-</sup> ont approximativement la taille attendue (493 bp et 574 bp) rendant improbable une amplification non spécifique avec les amorces utilisées. Le séquençage des bandes obtenues permettrait de confirmer cette hypothèse. Le contrôle de

chargement a été effectué avec des amorces spécifiques à l'actine et il valide que la même quantité d'ARN a été utilisée pour les différents échantillons puisque les fragments ont une expression semblable (Figure 6c).

### 3.1.4 Ségrégation anormale

Au cours du criblage des doubles mutants homozygotes, il s'est avéré plus difficile d'obtenir le mutant B09<sup>-</sup>/840<sup>-</sup> qu'aucun autre. Pour chacun des doubles, la première génération (F1) obtenue suite au croisement des deux génotypes donne une population hétérozygote pour les deux insertions ADN-T (-+/-+). Par contre, le criblage de la deuxième génération (F2) obtenue par autopollinisation de la F1 présente une différence parmi les croisements dans l'occurrence du mutant double homozygote (--/--) par rapport aux autres génotypes possibles, soit le double homozygote sauvage et les combinaisons hétérozygotes (Annexe 2). La distribution de Mendel issue du ratio de gamètes 25 :25 :25 :25 attendu pour deux loci indépendants ne semble pas respectée dans le cas de B09/840. De plus, pour le double mutant B09/840, l'occurrence du double mutant homozygote (--/--) possède une distribution anormale lorsque la F3 issue de l'autopollinisation de la F2 fixée pour une insertion (--/-+) est criblée. Ces résultats sont basés sur des observations partielles, car le criblage PCR n'a pas été effectué de façon à collecter des données détaillées sur l'occurrence des génotypes à travers les plants individuels de chaque croisement.



**Figure 6-** Croisements des mutants d'insertion et RT-PCR des lignées T-DNA.

**a.** Schématisation du croisement des mutants simples homozygotes des lignées d'insertion de chacun des gènes AtORK11, pour l'obtention de mutants doubles homozygotes **b**, **c**. RT-PCR sur les feuilles de la rosette des lignées T-DNA homozygotes des gènes AtORK11 et du type sauvage (Wt) en utilisant des amorces spécifiques à chaque gène (**b**) et avec les amorces pour le contrôle d'actine (**c**).

### 3.1.5 Analyse de la méiose

À partir des lignées de mutants dominants négatifs d'*AtORK11a* créées par Madoka Gray-Mitsumune, une analyse de la méiose du mégagamétophyte a été essayée. Les lignées dominantes négatives expriment une construction de l'ectodomaine et du domaine transmembranaire d'*AtORK11a*, ce qui produit une protéine pouvant interagir avec la protéine endogène par dimérisation, mais bloquant la transduction du signal par l'absence d'un domaine kinase. Les plants des lignées ND3 et NF7 ont été menés à floraison et les inflorescences fixées et traitées pour observer la méiose et l'arrangement des chromosomes au niveau de la cellule mère des mégasporocytes. Toutefois, les instruments utilisés ne procuraient pas la précision nécessaire pour disséquer les tissus au stade approprié à l'observation. Les aiguilles à insuline se sont révélées trop grosses, de même qu'un instrument utilisé pour récolter les nématodes (fourni par Émilie Maheux), soit un fil de métal accroché à un manche. Il a donc été impossible d'observer la méiose des mutants dominant négatifs.

## 3.2 Complémentation bimoléculaire par fluorescence (BiFC)

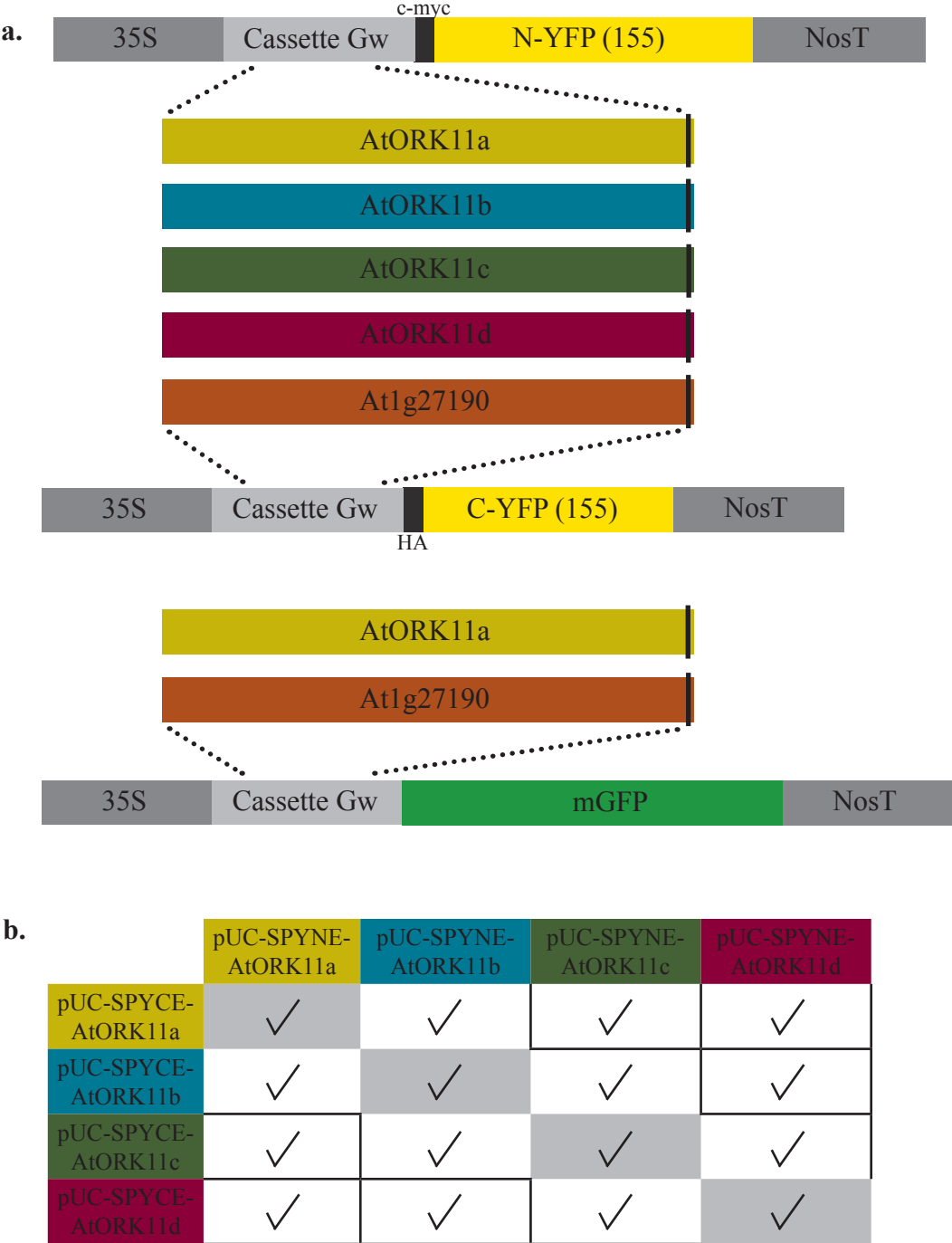
Le patron d'expression similaire des quatre gènes *AtORK11*, démontré par RT-PCR (Gray-Mitsumune, en préparation), ainsi que l'absence de phénotype pour le double mutant homozygote *AtORK11b/AtORK11c* de même que pour *AtORK11a/AtORK11b* (Tarutani et al., 2004a) et l'obtention d'un phénotype dans la lignée dominant négatif laissait entrevoir



la possibilité que les récepteurs agissent en dimères. Dans le but de déterminer le mode d'action des récepteurs, c'est-à-dire leur capacité d'homodimérisation et d'hétérodimérisation, et tout en tentant d'estimer quelles paires de récepteurs pouvaient fonctionner conjointement, nous avons utilisé la technique de complémentation bimoléculaire par fluorescence (BiFC).

### 3.2.1 Constructions et planification des essais

Le BiFC nécessite la création de fusions des récepteurs kinases avec les fragments de la YFP (yellow fluorescent protein) et des témoins. La version des vecteurs du BiFC choisie prévoit l'utilisation de la protéine fluorescente jaune séparée en deux fragments et plaçant la séquence d'intérêt en amont du fragment de la YFP. Les vecteurs compatibles avec la technologie Gateway ont été obtenus du laboratoire de Jörg Kudla (Walter et al., 2004). Ces vecteurs sont Gw-pUC-SPYNE et Gw-pUC-SPYCE pour les fragments N-terminal et C-terminal de la YFP respectivement (pour split YFP N-terminal/C-terminal fragment expression; Walter et al., 2004). Les constructions sont représentées dans la figure 7a, où chacune des séquences codantes des gènes *AtORK11* sans le codon stop sont fusionnées en phase avec les fragments de la YFP (Figure 7a). Chaque gène est cloné dans les deux vecteurs. De plus, les récepteurs kinases At1g27190 (LRR X) et AtSERK1 (LRR II; At1g71830), tous deux de taille semblable aux récepteurs AtORK11 avec 4 domaines LRR, ont été utilisés comme témoins pour le BiFC. Ils sont insérés dans les deux orientations de



**Figure 7-** Vecteurs du BiFC et essais planifiés  
**a.** Insertion de la séquence des cDNA de chacun des gènes sans le stop terminal dans les vecteurs pUC-SPYNE et pUC-SPYCE compatible avec la technologie Gateway **b.** Insertion similaire dans le vecteur pMDC83 **c.** Tableau représentant les co-bombardements de cellules d'épiderme d'oignon entrepris pour le BiFC des gènes *AtORK11*.

vecteurs YFP. Les gènes *AtORK11a* et *Atlg27190* sans leur codon stop ont aussi été insérés dans le vecteur pMDC83 pour une fusion en phase avec la GFP (Figure 7a) (Curtis et Grossniklaus, 2003).

L'objectif était de tester les 4 homodimérisations et les 12 possibles hétérodimérisations entre les gènes *AtORK11* (Figure 7b) grâce aux vecteurs précédemment décrits et en utilisant le bombardement de microparticules de tungstène comme méthode de transfection transitoire.

### **3.2.2 Interactions entre les récepteurs kinases**

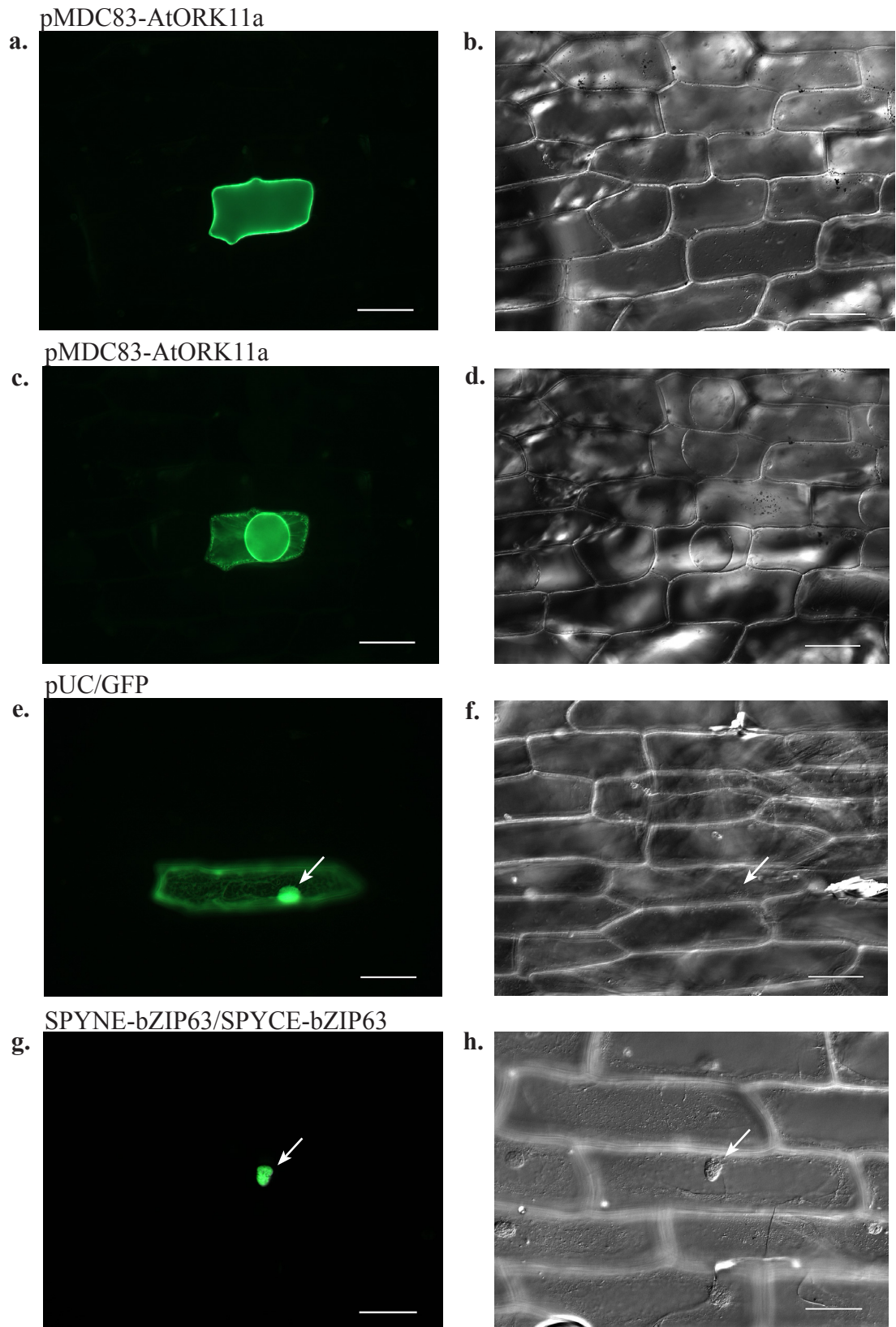
Le système de transformation utilisé est une fabrication artisanale ressemblant à la machine PDS-1000 à l'hélium de BioRad et dont l'optimisation pour l'épiderme d'oignon a mené à des résultats satisfaisants. Les interactions du BiFC dans les cellules transformées sont visualisées par microscopie à épifluorescence et les champs microscopiques correspondant sont aussi observés en contraste d'interférence différentiel (DIC) (Figures 8-10). L'ensemble des interactions testées par BiFC en utilisant le bombardement est répertorié à l'annexe 5.

Le récepteur *AtORK11a* est localisé à la membrane plasmique, tel que visualisé par la fusion GFP pMDC83-*AtORK11a* (Figure 8a). Cette localisation est confirmée par la plasmolyse de l'épiderme d'oignon qui entraîne une rétraction de la membrane et de son

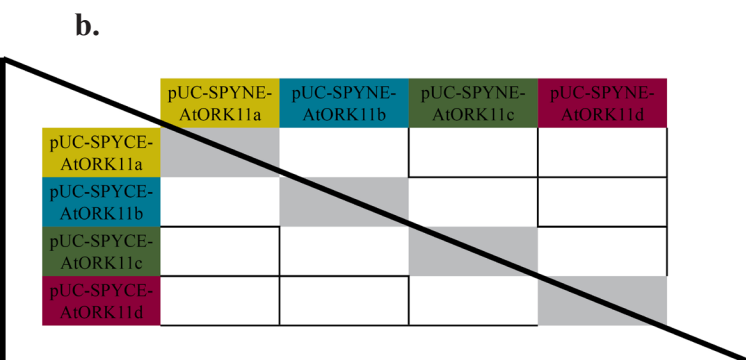
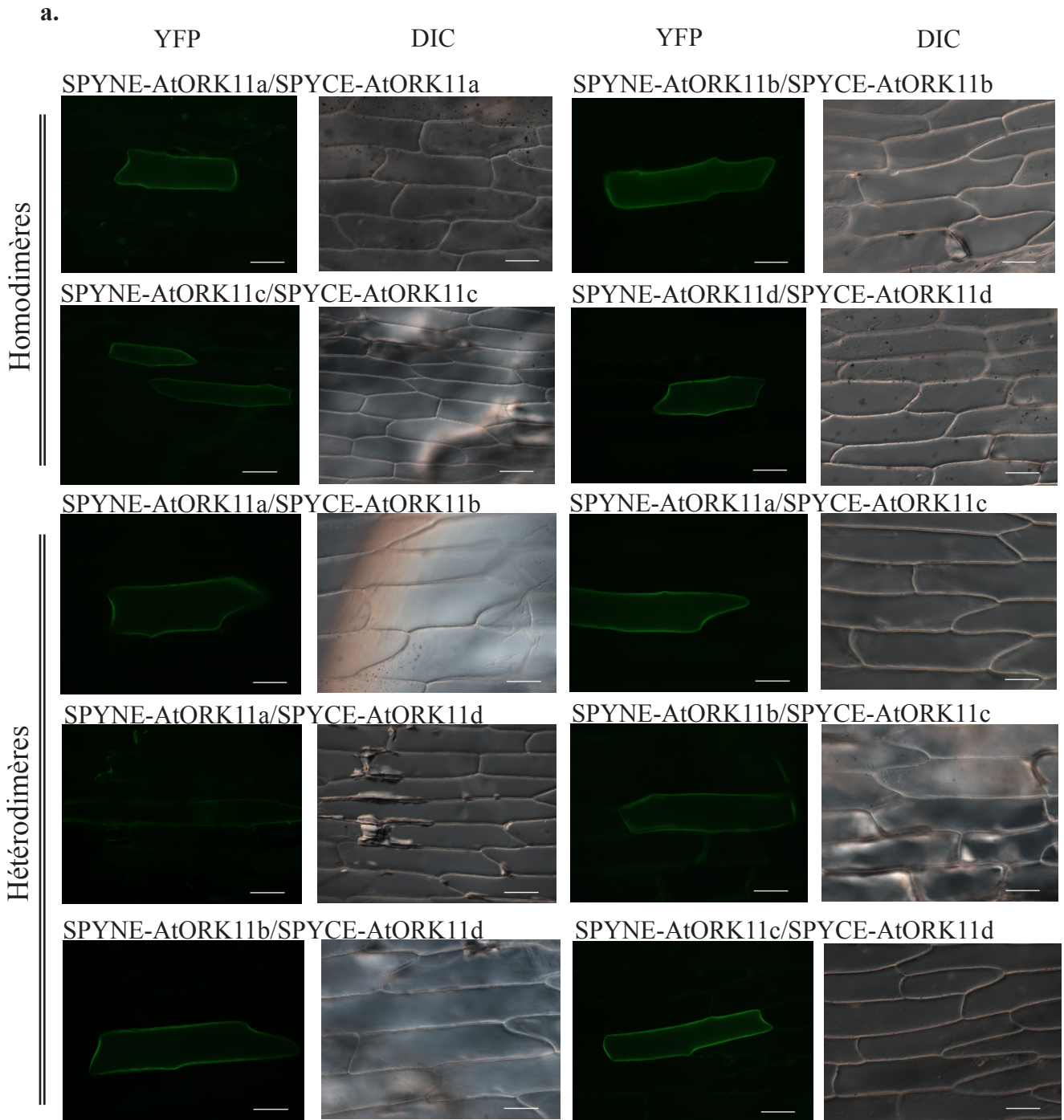
contenu cytoplasmique à l'intérieur de l'espace délimité par la paroi cellulaire (Figures 8c, d). De plus, la fluorescence de pMDC83-AtORK11a présente une localisation différente du vecteur pUC-GFP, soit la GFP sous l'expression du promoteur 35S, dont la fluorescence se situe dans le cytosol et dans le noyau (Figures 8e, f). Ainsi, il est évident que la fluorescence observée (Figure 8a) n'est localisée ni à l'extérieur de la cellule, ni dans le cytosol, mais bien au niveau de la membrane. Cette localisation membranaire correspond à ce qui avait été démontré par une fusion de la GFP et du gène sous le contrôle du promoteur natif (Tarutani et al., 2004a). Bien qu'ils soient peu visibles sur cette figure (7c), il est possible d'observer les filaments de Hecht, ou « Hechtian strands », soit les fils membranaires qui relient le protoplaste de la cellule plasmolysée à la paroi cellulaire (Oparka, 1994).

Le témoin positif pour l'optimisation du BiFC par bombardement a été l'homodimérisation du facteur de transcription bZIP63. La fluorescence résultant du co-bombardement de pUC-SPYNE-bZIP63 et de pUC-SPYCE-bZIP63 est localisée au noyau des cellules de l'épiderme d'oignon (Figures 8g, h). Ces observations de fluorescence démontrées par Walter (Walter et al., 2004) confirment dans ce cas-ci l'utilité de la machine artisanale pour le bombardement de cellules d'oignon en contexte de BiFC.

Tel que décrit précédemment (Figure 7b), les 4 gènes *AtORK11* ont premièrement été testés pour leur capacité d'homodimérisation. Le co-bombardement des vecteurs



**Figure 8-** Visualisation du bombardement de cellules d'épiderme d'oignon.  
**a, b.** pMDC83-AtORK11a localise à la membrane plasmique **c, d.** Épiderme exprimant pMDC83-AtORK11a (**a**) suite à la plasmolyse provoquée **e, f.** pUC/GFP localise au cytoplasme et dans le noyau (flèche) **g, h.** Dimérisation nucléaire (flèche) du co-bombardement de pUC-SPYNE-bZIP63 et de pUC-SPYCE-bZIP63 **a, c, e.** Fluorescence en GFP **g** Fluorescence en YFP **b, d, f, h.** DIC du champ microscopique correspondant. Barre d'échelle 100  $\mu\text{m}$ .



**Figure 9-** BiFC par co-bombardement de cellules d'épiderme d'oignon. Essais d'interaction pour les gènes *AtORK11*.

**a.** Homodimérisation ou hétérodimérisation à la membrane plasmique, fluorescence en YFP et DIC du champ microscopique correspondant. Barre d'échelle 100  $\mu$ m.

**b.** L'encadré triangulaire du tableau correspond aux interactions en BiFC représentées dans les photos en **a**.

pUC-SPYNE-*AtORK11a* et pUC-SPYCE-*AtORK11a* provoque une fluorescence localisée à la membrane (Figures 9a). Le résultat obtenu en BiFC, une fluorescence correspondant à la YFP localisée à la membrane, est identique pour toutes les paires d'homodimérisation testées (Figure 7b). Un exemple du résultat obtenu pour chacun de ces homodimères est représenté à la figure 9a. La figure 9b schématise les photos présentées en 9a, car elles correspondent à une des deux possibilités de combinaison (...N.../...C... ou ...C.../...N...) pour chaque interaction. Ainsi, il apparaît que les 4 récepteurs kinases de la famille AtORK11 soient capables de former des homodimères dans un système hétérologue de cellule d'oignon.

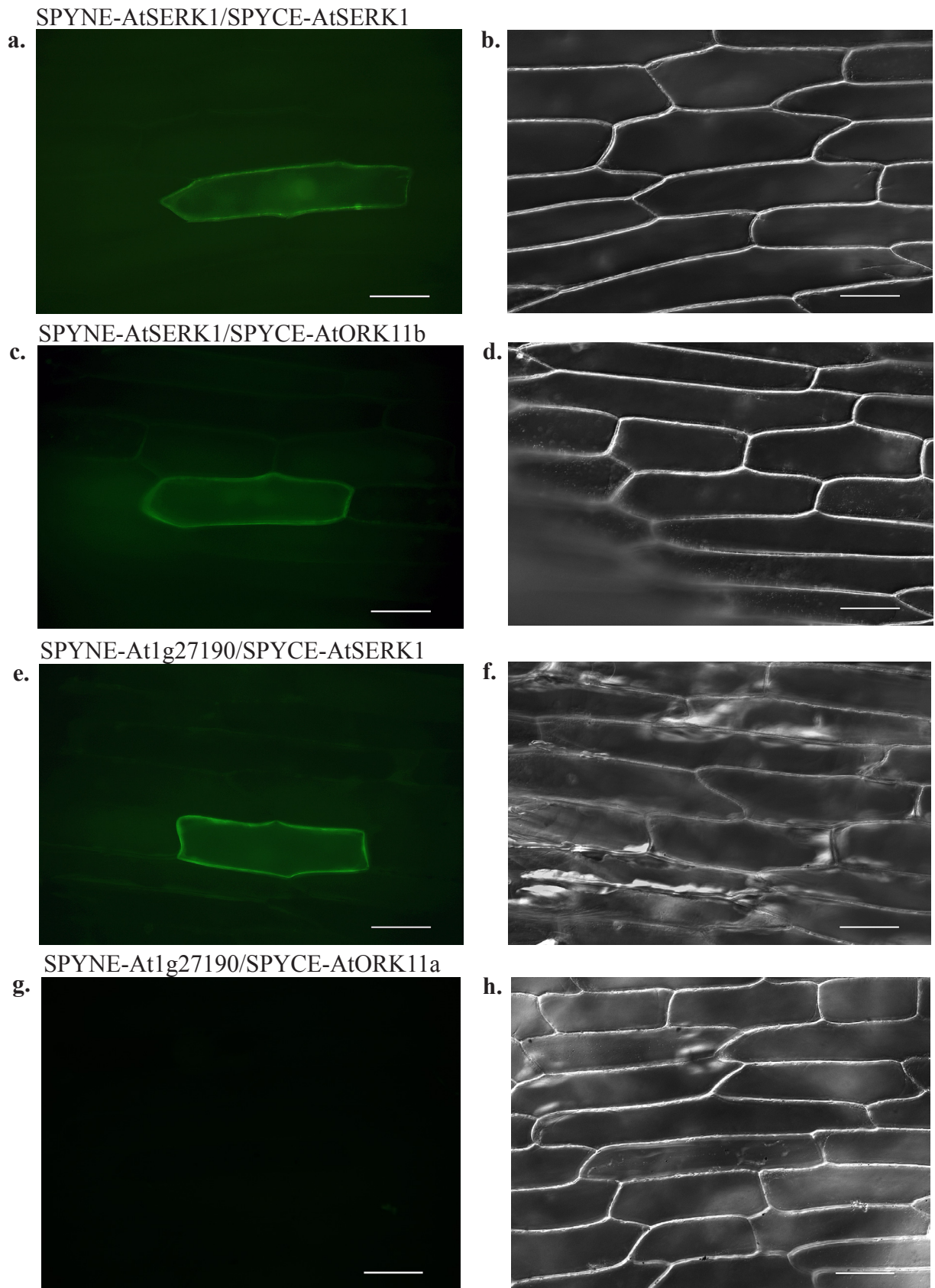
En second lieu, l'hétérodimerisation de toutes les combinaisons possibles (Figure 7b) a été évaluée par le BiFC. Le co-bombardement des vecteurs pUC-SPYNE et pUC-SPYCE fusionnés à des récepteurs différents de la famille AtORK11 résulte en une fluorescence détectable à la membrane plasmique des cellules d'oignon transformées (Figure 9a). Toutes les orientations testées mènent aussi à ce type de fluorescence membranaire, les résultats étant semblables pour une paire et son contraire (Figure 9a, b).

À l'opposé des résultats ci-dessus, aucune fluorescence n'est détectée lors du co-bombardement d'un gène fusionné au fragment de la YFP et du fragment complémentaire de la YFP exempt de toute fusion. Par exemple, le co-bombardement de pUC-SPYNE-*AtORK11a* et de pUC-SPYCE ne produit aucune fluorescence visible. Au moins une

orientation pour chaque gène a été testée et ne résulte en aucune fluorescence. De façon similaire, le co-bombardement, testé pour au moins une orientation, du gène fusionné au fragment de la YFP et de ce même fragment de la YFP vide ne provoque aucune fluorescence. De plus, le co-bombardement de pUC-SPYNE et de pUC-SPYCE n'engendre aucun signal fluorescent (photos non présentées).

Dans la recherche d'un témoin négatif, le gène *AtSERK1* a été testé pour l'homodimérisation et l'hétérodimérisation avec chacun des gènes *AtORK11*. Ce gène, tel que décrit succinctement dans l'introduction, est un récepteur kinase de type LRR II de taille semblable aux récepteurs AtORK11. Une homodimérisation localisée à la membrane plasmique est détectée suite au co-bombardement de pUC-SPYNE-AtSERK1 et de pUC-SPYCE-AtSERK1 (figure 10a, b), tel que prédit par des études précédentes (Shah et al., 2001; Russinova et al., 2004; Hink et al., 2008). Les interactions d'hétérodimérisation ont été testées entre AtSERK1 et les protéines AtORK11 pour au moins une orientation. Un signal fluorescent a été détecté pour tous les essais, par exemple entre pUC-SPYNE-AtSERK1 et pUC-SPYCE-AtORK11b (figure 10c, d). Un tableau récapitulatif de tous les essais de BiFC en bombardement est présenté en annexe, à la fois pour les tests d'interaction de la famille *AtORK11* ainsi que pour les tests d'interaction de tous les témoins (annexe 5). De plus, une interaction, détectée par la présence d'un signal fluorescent en YFP, a été obtenue suite au co-bombardement des fusions AtSERK1 et Atlg27190 (par exemple pUC-SPYNE-Atlg27190 et pUC-SPYCE-AtSERK1 figure





**Figure 10-** BiFC par bombardement de cellules d'épiderme d'oignon. Essais d'interaction des protéines témoins.

**a, b.** Homodimérisation de pUC-SPYNE-AtSERK1 et de pUC-SPYCE-AtSERK1 à la membrane plasmique **c, d.** Hétérodimérisation de pUC-SPYNE-AtSERK1 et de pUC-SPYCE-AtORK11b **e, f.** Hétérodimérisation de pUC-SPYNE-Atlg27190 et de pUC-SPYCE-AtSERK1 **g, h** Absence d'interaction de pUC-SPYNE-Atlg27190 et de pUC-SPYCE-AtORK11a **a, c, e, g.** Fluorescence en YFP **b, d, f, h.** DIC du champ microscopique correspondant. Barre d'échelle 100  $\mu$ m.

10e, f). Aucun signal fluorescent n'a été observé pour le co-bombardement d'une fusion d'un fragment de la YFP avec AtSERK1 et du fragment complémentaire exempt d'une fusion (photos non présentées).

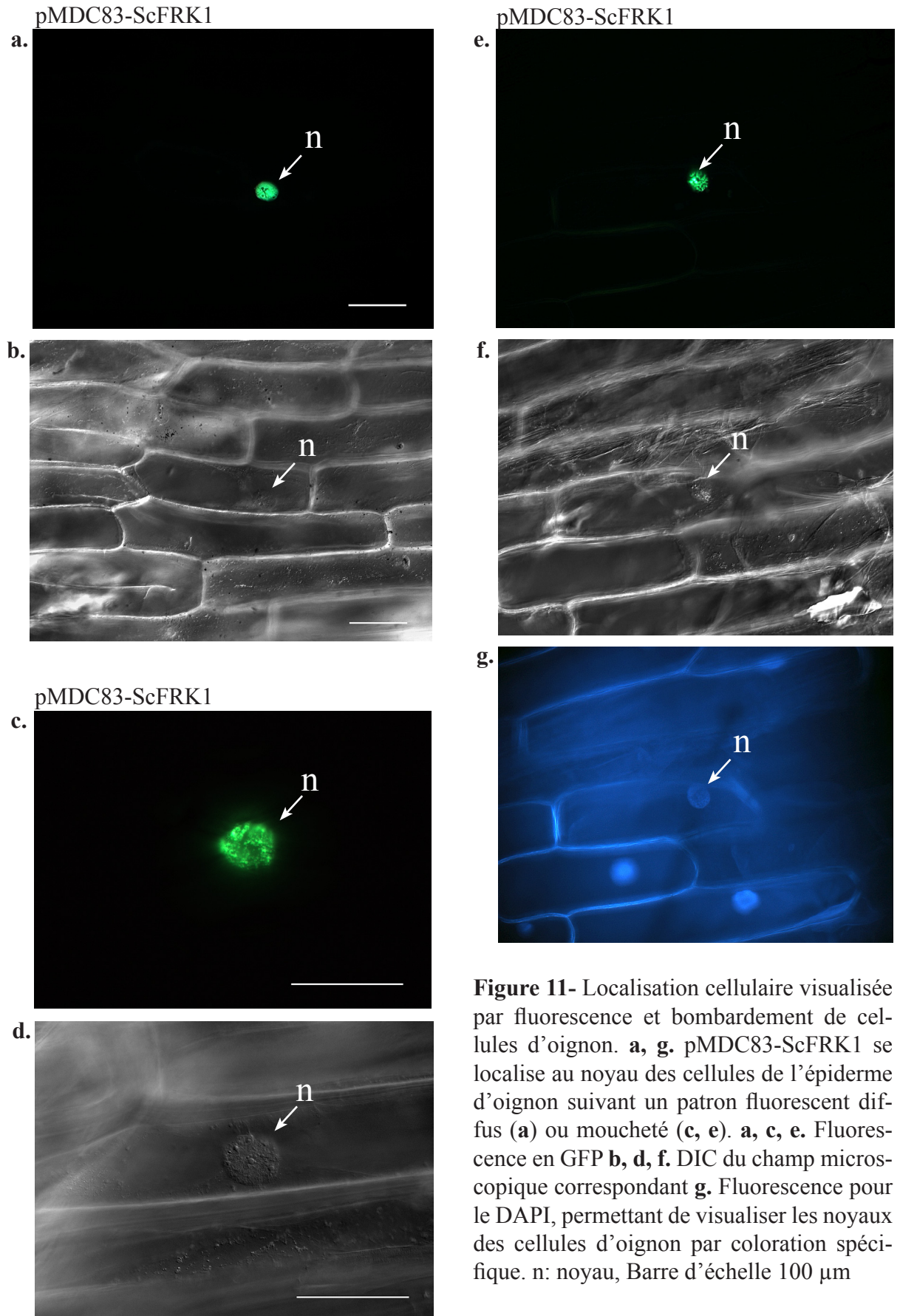
Le récepteur kinase LRR At1g27190 a aussi été envisagé comme témoin négatif aux essais du BiFC. La fusion de ce gène à la GFP, soit la construction pMDC83-At1g27190, présente une localisation membranaire similaire à celle d'AtORK11a (photo non présentée et figure 8a). Suite au co-bombardement de pUC-SPYNE-At2g27190 et de pUC-SPYCE-At1g27190, aucune fluorescence n'est détectée, signifiant qu'aucune homodimérisation n'a lieu. Les interactions d'hétérodimérisation entre le gène At1g27190 et les gènes *AtORK11* ont été testées pour une ou pour les deux orientations possibles et aucun signal n'est produit. Les figures 10 g et h présentent un exemple de ce résultat, pour pUC-SPYNE-At1g27190 et pUC-SPYCE-AtORK11a. Toutefois, un essai d'hétérodimérisation entre pUC-SPYNE-At1g27190 et pUC-SPYCE-AtORK11c a donné un résultat faiblement fluorescent au cours d'un unique bombardement. L'essai subséquent de cette même hétérodimérisation et de l'hétérodimérisation contraire (pUC-SPYNE-AtORK11c et pUC-SPYCE-At1g27190) n'a entraîné la détection d'aucune fluorescence. Il est donc probable que la fluorescence détectée ait été non spécifique ou due à une erreur de manipulation. Quoiqu'une interaction ait été obtenue suite au co-bombardement des fusions pUC-SPYNE-At1g27190 et pUC-SPYCE-AtSERK1 (figure 10e, f), l'absence d'homodimérisation pour At1g27190 nous a incité à vérifier cette construction par

séquençage. Le gène est en phase avec les fragments YFP dans les deux constructions et la séquence complète clonée ne contient aucune erreur. Ceci indique que la protéine kinase At1g27190 ne fonctionne qu'en hétérodimère, même avec des protéines non apparentées.

### **3.3 Études complémentaires de localisation subcellulaire de gènes impliqués dans la gamétogenèse et le développement**

Deux essais de localisation subcellulaire ont été effectués avec des gènes étudiés au laboratoire en utilisant la technique du bombardement de microparticules de tungstène. Premièrement, la localisation du produit du gène *ScORK28* a été déterminée. Ce gène code pour une PRK de la famille LRR-V préférentiellement exprimée dans les ovaires chez *S. chacoense* (Germain et al., 2007). Le bombardement de la fusion pMDC83-ScORK28 (créée par Hugo Germain) présente un signal fluorescent à la membrane plasmique des cellules d'oignon transformées (voir Germain et al., 2007). La plasmolyse produit le même effet que sur les cellules bombardées avec les récepteurs AtORK11, confirmant la localisation membranaire. Deuxièmement, la localisation du produit du gène *ScFRK1* a été déterminée. Le gène *ScFRK1* code pour une MAP3K (MAP kinase kinase kinase) de la famille des pMEKK et est impliqué dans la mégagamétogenèse et la microgamétogenèse chez *S. chacoense* (Lafleur, 2009). La fluorescence détectée pour la fusion pMDC83-ScFRK1 est principalement localisée au noyau des cellules d'épiderme d'oignon (Figure

11). Une fluorescence résiduelle dans le cytoplasme est observée dans un très faible nombre de cellules (photo non présentée). La fluorescence au noyau adopte deux aspects différents. La majeure partie des noyaux présente une fluorescence diffuse à l'intérieur du noyau, similaire à celle retrouvée pour pUC/GFP ou pour l'interaction de bZIP63 en BiFC (Figures 11a et 8e, g). Les autres noyaux, moins nombreux, présentent une fluorescence mouchetée à l'intérieur du noyau (Figure 11c). Une coloration au DAPI a confirmé la localisation nucléaire dans les cellules d'oignon (photos non présentées).



**Figure 11-** Localisation cellulaire visualisée par fluorescence et bombardement de cellules d'oignon. **a, g.** pMDC83-ScFRK1 se localise au noyau des cellules de l'épiderme d'oignon suivant un patron fluorescent diffus (**a**) ou moucheté (**c, e**). **a, c, e.** Fluorescence en GFP **b, d, f.** DIC du champ microscopique correspondant **g.** Fluorescence pour le DAPI, permettant de visualiser les noyaux des cellules d'oignon par coloration spécifique. n: noyau, Barre d'échelle 100  $\mu$ m

## 4. Discussion

### 4.1 Les récepteurs AtORK11

#### 4.1.1 Analyse phénotypique des mutants d'insertion

Par une approche de dominant négatif chez *Arabidopsis thaliana*, un phénotype de fertilité réduite, d'inhibition du développement du sac embryonnaire et de létalité du pollen avait été trouvé pour les lignées de surexpression de la version tronquée du récepteur kinase AtORK11a (Gray-Mitsumune, M., Houde, J., Matton, D.P., en préparation). Toutefois, le mutant d'insertion ADN-T pour ce même gène ne provoque pas de phénotype altéré détectable. Sachant que trois autres récepteurs kinases possèdent une grande similarité de séquence, la possibilité de redondance fonctionnelle au sein de cette famille a été évaluée par des mutations multiples. Les doubles mutants ADN-T obtenus par croisement (Figure 6) présentent un phénotype semblable au contrôle de type sauvage. Les différences notées pour le dominant négatif n'ont pas été retrouvées au sein des lignées ADN-T. Toutefois, le RT-PCR effectué à partir des feuilles de la rosette de chaque mutant d'insertion a démontré une rétention de l'expression des gènes dans le cas de B09<sup>-</sup> et 366<sup>-</sup>, soit pour les gènes *AtORK11a* et *AtORK11d*. Puisque ces deux gènes conservent à tout le moins un minimum d'expression, si ce n'est une expression de niveau normal, le seul double mutant pouvant être pris en compte est 840<sup>-</sup>/094<sup>-</sup>. Aucun phénotype particulier n'a pu être associé à ce double mutant « knock-out » pour les gènes *AtORK11c* et *AtORK11b*.

La rétention d'une expression pour les gènes *AtORK11a* et *AtORK11d* dans les mutants respectifs pourrait s'expliquer de deux façons. Le gène ciblé peut être dupliqué dans le génome, une copie étant affectée par l'ADN-T et l'autre copie conservant une expression normale. Une analyse Southern permettrait d'évaluer le nombre de copies de chacun des gènes dans le génome. Toutefois, cette alternative peut être négligée puisqu'une analyse bioinformatique utilisant les séquences d'*AtORK11a* et d'*AtORK11d* et le génome complètement séquencé d'*Arabidopsis* n'identifie pas d'événement de duplication pour ces gènes. La seconde alternative est l'effet de la position des insertions de l'ADN-T au sein du gène. Lorsque l'élément ADN-T est dans un exon ou dans le promoteur et crée une expression nulle, le mutant est qualifié de « knock-out ». Si l'élément est dans le promoteur ou dans le 3'UTR et crée une réduction de l'expression, c'est un mutant « knock-down » (Krysan et al., 1999). Ainsi, la position de l'élément ADN-T à l'intérieur d'*AtORK11a* et d'*AtORK11d* est probablement responsable de la rétention d'expression. Cependant, la possibilité que les insertions ADN-T dans le promoteur d'*AtORK11d* et dans le 3' UTR d'*AtORK11a* possèdent une influence négative, même s'il y a transcription, est faible mais cette possibilité existe. Un PCR quantitatif permettrait de différencier entre une expression diminuée (« knock-down ») et une expression normale des gènes. De plus, la présence de la longue séquence du ADN-T dans l'ARNm pourrait influencer la traduction, même si l'expression reste semblable, par exemple en créant des structures secondaires. Un Northern permettrait de distinguer s'il y a effectivement un changement au niveau de

l'ARNm entre les mutants et le type sauvage, puisque l'hybridation de la sonde correspondrait à une taille plus grande si l'insertion du ADN-T provoquait un allongement de l'ARNm. Au départ, le Northern avait été essayé pour vérifier l'expression des gènes parmi les quatre mutants mais, suite à un échec, l'approche par RT-PCR a été privilégiée. Malgré ces deux hypothèses, les doubles mutants impliquant les lignées B09<sup>-</sup> et 366<sup>-</sup> présentent tout de même un phénotype normal.

L'absence de phénotype pour le double mutant fonctionnel *AtORK11b/AtORK11c* peut avoir deux significations; redondance fonctionnelle et absence de corrélation. Premièrement, il peut y avoir redondance fonctionnelle, c'est-à-dire que les deux autres récepteurs non mutés peuvent occuper le rôle de ceux inactifs. Il a été démontré auparavant que les séquences des deux gènes sont similaires, rassemblant la paire *AtORK11a* et *AtORK11b* et celle d'*AtORK11c* et *AtORK11d* qui lui est fortement apparentée. De plus, le patron d'expression des gènes encourage l'hypothèse de redondance dans la mesure où les gènes se retrouvent de façon concomitante dans certains tissus. Les récepteurs *AtORK11a*, *AtORK11c* et *AtORK11d* ont aussi été identifiés parmi les protéines des microdomaines de la membrane plasmique, soit des régions résistantes au détergent isolées au Triton X-100 (Shahollari et al., 2004). Il est proposé que ces microdomaines créent des radeaux membranaires (« membrane rafts ») dont la formation est encore peu étudiée, mais qui pourraient être impliqués dans la polarisation cellulaire et la formation de domaines distincts au sein des membranes, nécessaires à plusieurs étapes du développement (Zappel



et Panstruga, 2008). Chez les animaux, il est également proposé que ces microdomaines possèdent une composition protéique et lipidique unique dont l'enrichissement en molécules de signalisation pourrait en faire des centres de signalisation (Shahollari et al., 2004). La présence des trois récepteurs dans les microdomaines pourrait indiquer une interaction, une organisation dans un environnement membranaire similaire ou des propriétés biochimiques semblables. De plus, Tarutani et al. ont identifié par double hybride trois protéines inconnues interagissant avec les domaines kinases d'AtORK11a et d'AtORK11b, suggérant une certaine signalisation commune au niveau des partenaires d'interaction intracellulaires (Tarutani et al., 2004b). Dans tous les cas, dans l'éventualité de redondance fonctionnelle il faudrait poursuivre les croisements afin d'obtenir les triples mutants et éventuellement les quadruples mutants. Dans la possibilité où les quatre gènes *AtORK11* créent une famille avec des rôles partiellement redondants, l'abolition de l'expression des quatre gènes à la fois risque de créer un effet notable. Toutefois, une stratégie alternative au mutant d'insertion ADN-T serait à adopter pour parvenir au quadruple mutant, puisque les seuls ADN-T disponibles pour *AtORK11a* et *AtORK11d* ne se sont pas révélés être un bon choix. La stratégie d'ARN interférence (ARNi) permettrait de faire un « knock-out » ou un « knock-down » de ces deux gènes problématiques. Contrairement aux mutants d'insertion où une perturbation dans un gène entraîne la perte de sa transcription, l'ARNi empêche la synthèse de la protéine par la dégradation de son ARNm suite à l'insertion d'un double brin d'ARN spécifique au gène cible (Waterhouse et Helliwell, 2003).

Deuxièmement, le mutant *AtORK11b/AtORK11c* ne constitue pas un « knock-out » des gènes les plus proches dans l'arbre phylogénétique (Figure 4). Il pourrait s'avérer que *AtORK11a* et *AtORK11b* sont redondants pour assurer un rôle précis et que *AtORK11c* et *AtORK11d* assurent un rôle différent de façon redondante. Selon cette hypothèse, les simples mutants n'auraient pas de phénotype visible dû à la redondance, les doubles *AtORK11a/AtORK11b* et *AtORK11c/AtORK11d* auraient une perte de fonction, mais les autres doubles, dont *AtORK11b/AtORK11c*, n'auraient pas d'altérations étant identiques aux simples.

#### 4.1.2 Analyse de la méiose

Tel qu'analysé par Madoka Gray-Mitsumune, les lignées transgéniques des dominants négatifs d'*AtORK11a* ont une fertilité réduite qui pourrait représenter un problème au point de chevauchement de la sporogénèse et de la gamétogénèse. La sporogénèse forme les quatre mégaspores, dont trois dégénèrent, à partir de la méiose de la cellule mère des mégaspores. Par la suite, la mégaspore fonctionnelle entamera la série de mitoses menant à la formation du sac embryonnaire, le gamétophyte femelle. Chez le dominant négatif, au stade où normalement il y a initiation des mitoses, deux types d'ovules sont observés; l'ovule de type Wt à deux noyaux avec vacuole centrale et l'ovule contenant une structure de dégénérescence nommée « finger-like ». La cytologie du développement gamétophytique d'*Arabidopsis* est bien connue et les mécanismes moléculaires sous-jacents

sont étudiés par un nombre croissant d'études portant sur des mutants gamétophytiques. Plusieurs mutants ont été caractérisés avec un rôle au niveau de la méiose ou au niveau gamétophytique, regroupant entre autres le développement gamétophytique, la progression du cycle cellulaire mitotique, la germination du tube pollinique, le guidage et la fertilisation (Liu et Qu, 2008). Quelques mutations identifiées par Christensen et al. provoquent un arrêt du développement des ovules au stade FG1 (stade uninucléé) (Christensen et al., 1997; Christensen et al., 1998). Une mutation du gène *AtXRCC3* perturbe la méiose et provoque un arrêt du développement après la méiose, produisant un ovule avec une seule cellule ou avec le produit de la dégénérescence de la cellule (Bleuward et White, 2004). Une analyse d'ARNi pour le gène *AtCDC45* démontre son rôle dans la méiose, et résulte en un ovule qui se développe sans sac embryonnaire (Stevens et al., 2004). Le gène *AtMDC1* possède aussi une fonction dans la méiose, et le phénotype du mutant montre une méiose aberrante dont le résultat est des ovules avec des cellules dégénérantes visibles (Couteau et al., 1999). Les ovules d'une mutation du gène *AHP2* présentent un sac embryonnaire sous la forme d'une structure très réduite, de même qu'un défaut dans la croissance des téguments (Schommer et al., 2003). Ces gènes, bien qu'ayant des fonctions variées, possèdent un phénotype qui s'apparente à celui observé pour le dominant négatif d'*AtORK11a*. Ainsi, l'observation de la méiose des lignées dominant négatif aurait permis de situer plus précisément le problème phénotypique par rapport au développement gamétophytique et possiblement d'éclaircir la fonction du gène. Malheureusement, la tâche était impossible, tel qu'essayé selon le protocole de Barrell et Grossniklaus (Barrell et Grossniklaus, 2005).

La tâche était trop délicate pour les outils utilisés. Il faudrait envisager une méthode de dissection différente ou tenter une optimisation en profondeur du protocole de coloration pour minimiser la nécessité de manipulation de l'échantillon avant l'observation.

#### 4.1.3 Ségrégation anormale

Bien qu'une analyse détaillée de la ségrégation n'ait pas été effectuée, le double mutant B09<sup>-</sup>/840<sup>-</sup> (*AtORK11a/AtORK11c*) fut difficilement obtenu comparativement aux autres doubles mutants. Il est probable d'obtenir des déviations Mendéliennes suite à des réarrangements chromosomiques. Ceux-ci, telles les translocations et les inversions, peuvent former des structures particulières à la méiose, ce qui affecte le type de gamète et leur fréquence (Nacry et al., 1998). Selon Castle et al., les réarrangements chromosomiques majeurs pourraient être fréquents dans les lignées ADN-T (Castle et al., 1993). Aussi, des réarrangements mineurs sont fréquemment reliés à l'insertion de l'ADN-T dans le génome, principalement sous la forme de délétions ou de duplications de courtes régions de l'ADN ou de l'ADN-T (Forsbach et al., 2003). Par exemple, il a été démontré qu'une translocation entre deux insertions ADN-T indépendantes sur des chromosomes différents menait à une distorsion du patron de distribution de la F2 d'un croisement et à la semi-stérilité de l'hétérozygote d'un des deux ADN-T (Curtis et al., 2009). Toutefois, le double mutant ciblé par cette étude a été obtenu dans un ratio normal par une autopollinisation de la F2 fixée (--/-+), ce qui n'est pas le cas de B09/840. De plus, le problème de ségrégation du double mutant B09/840 ne s'est reproduit avec aucun des autres doubles mutants. Le croisement de

l'un ou l'autre de ces ADN-T avec 366<sup>-</sup> ou 094<sup>-</sup> a donné une distribution normale des homozygotes. Il est probable qu'un réarrangement impliquant l'ADN-T de B09 ou de 840 et un autre ADN-T non identifié dans l'une des lignées ou une séquence génomique se reproduirait lors des différents croisements. D'autre part, les deux gènes en cause dans le mutant B09/840 sont situés sur le même chromosome. Pour créer le double homozygote, l'obtention d'un gamète portant les deux insertions ADN-T est nécessaire et implique une recombinaison. Par crossing-over, les deux insertions qui sont au départ situées sur les deux chromatides sœurs doivent se retrouver sur le même chromatide. Il est probable que la ségrégation anormale observée puisse être attribuée à cette nécessité de recombinaison dont la fréquence est un facteur limitant. Bref, la ségrégation anormale observée pour le double mutant B09/840 est probablement causée par des contraintes de recombinaisons plutôt que par un réarrangement chromosomique. Toutefois, une estimation plus précise du ratio obtenu pour chacune des combinaisons de gamètes et une évaluation de la semi-stérilité du pollen et des ovules des hétérozygotes permettrait à l'avenir de discriminer facilement une interférence dans la construction d'un mutant ADN-T multiple.

## **4.2 Étude du mode d'action par le BiFC**

Étant donné le patron d'expression similaire des quatre récepteurs AtORK11 et de la possibilité d'une redondance fonctionnelle, le mode d'action des protéines a été évalué par la méthode du BiFC. La technique de transformation et de visualisation de l'interaction est

le bombardement de microparticules de tungstène dans les cellules d'épiderme d'oignon. Le bombardement de microparticules est fréquemment employé pour la transformation et puisqu'un appareil était disponible, cette technique a été privilégiée. Le protocole de bombardement a dû être optimisé et, au départ, deux échantillons végétaux ont été testés. Les cellules de *Nicotiana tabacum* en suspension se sont avérées difficiles à manipuler pour la préparation au bombardement et pour l'observation subséquente, et le maintien des cultures liquides était laborieux. D'autre part, les oignons ne posaient aucun problème d'approvisionnement et la manipulation des épidermes était beaucoup plus aisée. Ainsi, un degré de reproductibilité et une efficacité suffisante ont été obtenus avec le bombardement des cellules d'épiderme d'oignon. En outre, les témoins positifs se sont révélés identiques à ceux présentés dans la littérature et ont démontré la possibilité d'utiliser le bombardement de microparticules pour des essais de localisation et d'interaction (figure 8).

Le vecteur pMDC83-AtORK11a qui fusionne AtORK11a en amont de la GFP, outre sa localisation membranaire en accord avec le travail d'auteurs précédents, démontre aussi que cette orientation est suffisamment flexible pour que la protéine fluorescente prenne une conformation adéquate pour l'émission du signal fluorescent. Dans cette orientation, le récepteur kinase peut adopter sa localisation transmembranaire et la GFP est en position cytoplasmique, accrochée à la portion terminale du domaine kinase.

#### 4.2.1 Homodimérisation

L'intérêt du BiFC pour le mode d'action des récepteurs était d'examiner la capacité d'homodimérisation de chacune des protéines et la possibilité d'hétérodimérisation entre elles. Notre hypothèse de travail étant que les hétérodimères formés pourraient nous indiquer lesquels des gènes de la clade *AtORK11* pourraient travailler de concert et nous indiquer quels seraient les doubles ou triples mutants à cibler pour contourner l'effet de redondance génique observé. Il a été démontré que les récepteurs kinases *AtORK11* peuvent se retrouver sous la forme d'un homodimère localisé à la membrane plasmique (Figure 8). Cette dimérisation propose la présence d'une interaction entre les récepteurs kinases, tel que nécessaire pour la reconstitution de la protéine YFP fragmentée. Le système hétérologue utilisé ne permet toutefois pas de spécifier si l'interaction est constitutive ou dépendante de la présence d'un ligand. En effet, il est impossible de déterminer si le ligand est présent dans les cellules d'oignon. Dans les études précédentes, aucune recherche n'a été faite pour le ligand d'*AtORK11a*, de même qu'aucune paire ligand-récepteur n'a été établie pour les gènes *AtORK11*. Présentement, peu de données sont connues sur les ligands des récepteurs kinases LRR des plantes. De plus, les données recueillies à ce jour pour les plantes ne permettent pas d'identifier spécifiquement des ligands potentiels à partir de la séquence des récepteurs kinases et en utilisant des outils bioinformatiques. Peu de paires de ligand-récepteurs ont été identifiés de façon directe ou indirecte, les modes d'interaction étant connus pour certaines paires seulement (Matsubayashi, 2003; Torii, 2004; Butenko et al., 2009). Le récepteur d'auto-

incompatibilité SRK forme un homodimère en absence du ligand, dû à deux régions précises dans le domaine extracellulaire (Naithani et al., 2007). Le récepteur BRI1 est aussi présent sous forme d'homodimère et le ligand induit un changement de conformation permettant l'activité catalytique et l'interaction avec le récepteur BAK1 (Li et al., 2002; Russinova et al., 2004; Wang et al., 2005). Le récepteur de la flagelline, FLS2, est présent de façon monomérique et sa liaison au ligand induit la création d'un complexe avec BAK1 (Ali et al., 2007; Chinchilla et al., 2007; Heese et al., 2007). Ainsi, les paires connues de récepteurs kinases LRR pointent vers une interaction protéine-protéine ligand indépendante, mais parfois ligand dépendante pour la formation d'un complexe de signalisation actif. Chez les animaux, certains récepteurs tel que le récepteur du facteur nécrotique des tumeurs TNFR ont une association dimérique ou oligomérique ligand indépendante qui est contrôlée par des régions spécifiques nommées PLADs (« pre-ligand-binding assembly domains »; Chan et al., 2000). Les quatre récepteurs de la famille du facteur de croissance épidermique (ErbB) forment aussi une homodimérisation et une hétérodimérisation inactive en absence du ligand (Tao et Maruyama, 2008). Bref, bien qu'il y ait définitivement interaction, c'est-à-dire homodimérisation et hétérodimérisation des récepteurs kinase AtORK11 celle-ci pourrait être ligand indépendante ou ligand dépendante, quoique la différence du système végétal (oignon vs *Arabidopsis*) couplée à un patron d'expression plus spécifique aux tissus reproducteur pour les gènes ciblés, suggèrent que dans les cellules d'épiderme d'oignon, les chances sont faibles d'avoir la présence d'un ligand pour les protéines kinases AtORK11. Il serait donc plus probable que les PRK de la



clade AtORK11 forment des dimères indépendamment de la présence d'un ligand, tel qu'observé pour les récepteurs mentionnés ci-dessus. De plus, dans le système utilisé ici il est aussi impossible de vérifier si l'homodimère constitue la voie activée. La fluorescence détectée indique qu'une interaction a eut lieu, mais n'indique pas si la ou les protéines d'interaction intracellulaire sont recrutées ou s'il y a phosphorylation des récepteurs. Il n'y a pas de rapporteurs de l'activation de la voie de signalisation.

#### **4.2.2 Hétérodimérisation**

Le BiFC a aussi démontré la capacité d'hétérodimérisation des récepteurs kinases AtORK11 (Figure 7b, 9). Les quatre protéines s'associent entre elles selon toutes les combinaisons possibles et l'interaction se localise à la membrane plasmique. Tel que le bombardement le permet, la méthode n'étant pas quantitative, aucune paire ne se démarque des autres. L'hétérodimérisation des récepteurs vient soutenir l'hypothèse de redondance fonctionnelle au sein du regroupement des quatre gènes AtORK11. Effectivement, si les récepteurs sont capables d'interaction, il est possible que leur mode d'action pour la signalisation passe aussi bien par une homodimérisation que par une oligomérisation. De façon à pouvoir compléter un gène perturbé par une insertion ADN-T, le produit du second gène doit pouvoir interagir avec le partenaire protéique du premier. Puisque toutes les combinaisons testées ont donné un signal fluorescent (Figure 7b), cette hypothèse semble la plus probable sur la base de nos résultats. Ainsi, l'absence de phénotype du double mutant *AtORK11b/AtORK11c* pourrait s'expliquer par cette redondance

fonctionnelle. Plusieurs évidences récentes pointent vers des relations complexes entre des familles de récepteurs et des familles de ligands peptidiques et la redondance fonctionnelle est évoquée dans certaines études sur des récepteurs kinases LRR (Butenko et al., 2009). Une mutation dominant négatif menant à une accentuation du phénotype nul pour le récepteur ERECTA, impliqué dans la croissance des entrenoeuds et des organes, a montré la possibilité d'une interaction de plusieurs récepteurs kinases pour la modulation de cette voie de signalisation (Shpak et al., 2003). Il a été démontré que deux RLK-LRR paralogues à ERECTA, ERL1 et ERL2, possèdent un rôle redondant mais unique au sein de la voie de signalisation impliquant ERECTA (Shpak et al., 2004). Ces trois gènes, très similaires au niveau de leur séquence, possèdent des patrons d'expression particuliers mais qui se chevauchent. Ni les simples mutants ni le double mutant pour ERL1 et ERL2 ne présentent de phénotype altéré, mais les doubles mutants *erecta/erl1* et *erecta/erl2* présentent un phénotype accentué du mutant nul *erecta*, le triple mutant étant très fortement affecté (Shpak et al., 2004). Une hypothèse publiée pour la voie de CLAVATA est la présence de deux complexes de signalisation en parallèles. D'une part le récepteur LRR CLAVATA1 et d'autre part l'interaction du RLP (« receptor-like protein ») CLAVATA2 et de la protéine kinase associée à la membrane CORYNE agiraient de façon redondante sur la différenciation des cellules méristématiques du méristème apical végétatif (Müller et al., 2008). Le complexe CLAVATA2/CORYNE est aussi impliqué dans d'autres aspects du développement et dans la régulation du méristème apical racinaire (Miwa et al., 2008). Aussi, les récepteurs kinases LRR BAM1 et BAM2 faisant partie d'un groupe

monophylétique avec CLV1 ont une fonction redondante avec ce dernier dans la région du méristème en plus d'une probable séquestration des ligands de la famille CLV3 (ligands CLE; DeYoung et al., 2008). La voie de signalisation de CLAVATA implique donc un complexe réseau de récepteurs, et de ligands, permettant le réglage minutieux de la réponse. Dans le cas de l'abscission des organes floraux, un complexe de deux récepteurs LRR et d'une famille de ligands putatifs, les « IDA-Like proteins », ont été identifiés par des liens génétiques. Pour recréer le phénotype de l'abscission déficiente des organes floraux conféré par une mutation du ligand peptidique *ida*, les deux LRR HAESA et HAESA-LIKE2 doivent être knock-out, démontrant leur redondance fonctionnelle (Cho et al., 2008; Stenvik et al., 2008). HAE et HSL2 ont 45 % d'identité et un patron d'expression semblable. Bref, l'occurrence de ces exemples de redondance fonctionnelle parmi des RLK-LRR encourage l'hypothèse dans le cas de la famille AtORK11.

Toutefois, le BiFC se limite à la possibilité d'hétérodimérisation des récepteurs, sans confirmer un mode d'action précis. Tous les récepteurs sont à la membrane, tous homodimérisent et hétérodimérisent, trois d'entre eux sont enrichis dans les microdomaines membranaires et ils possèdent des patrons d'expression qui se chevauchent. Pourtant, le BiFC ne fait pas état d'une préférence d'interaction et il est impossible de distinguer les paires d'interaction au niveau de leur potentiel d'activation de la voie de signalisation. Une variation du BiFC, le BiFC multiple (« multicolor BiFC », mBiFC) peut révéler des préférences d'interaction entre les partenaires, car elle permet la visualisation de complexes

protéiques de façon simultanée dans une même cellule et l'efficacité de formation des complexes peut être quantifiée (Hu et Kerppola, 2003). Le mcBiFC a démontré l'hétérodimérisation préférentielle de bJun/bFos plutôt qu'avec bATF2 et mis à jour les efficacités relatives de la dimérisation entre les facteurs de transcription Myc, Mad et Max (Hu et Kerppola, 2003; Grinberg et al., 2004). Le mBiFC serait donc une variante à tester pour une interaction privilégiée de certains récepteurs.

#### **4.2.3 Témoins négatifs**

L'interaction des récepteurs kinases AtORK11 a été visualisée par BiFC dans un système hétérologue et en surexpression. Une attention particulière a donc été portée à la vérification de la spécificité d'interaction entre ces protéines similaires. Les témoins négatifs usuels n'ont montré aucune fluorescence, par exemple les combinaisons gène-SPYNE/SPYCE, gène-SPYNE/gène-SPYNE ou encore SPYNE/SPYCE. Toutefois, l'utilisation de contrôles additionnels est fréquemment recommandée (Kerppola, 2006). C'est pourquoi le clonage des gènes SRK6 et BRI1 dans les vecteurs de la YFP fragmentée a été entrepris, étant disponibles puisque étudiés par un collègue du laboratoire. Ces deux récepteurs kinases LRR dont l'homodimérisation a été démontrée (Rusinov et al., 2004; Naithani et al., 2007) auraient été intéressants pour évaluer la spécificité d'interaction, mais des erreurs se sont glissées dans les constructions. Les gènes n'étaient pas dans le même code de lecture que la protéine fluorescente, dû à une ou plusieurs erreurs ponctuelles au

sein de la séquence, tel que vérifié par le séquençage des vecteurs. À la fois les fusions GFP et les essais d'interaction YFP ne résultaient en aucune fluorescence détectable.

Plutôt que de reprendre le clonage au complet, un autre récepteur kinase, AtSERK1 (At1g71830), a été sélectionné pour vérifier son absence d'interaction avec les récepteurs AtORK11 et donc la spécificité des hétérodimérisations entre les gènes *AtORK11*. L'expression comparée de ce gène et de celle du gène *AtORK11a* possède un coefficient de corrélation significatif, tel que prédit par analyse bioinformatique en utilisant les banques publiques d'informations d'AtGenExpress (Gray-Mitsumune et al., en préparation). Ce récepteur de la famille LRR II (Shiu et Bleecker, 2001) possède un rôle dans le développement de la compétence pour l'embryogenèse somatique, dans la fertilité masculine, de même qu'un rôle dans la voie des brassinostéroïdes (Hecht et al., 2001; Albrecht et al., 2005; Colcombet et al., 2005; Karlova et al., 2006). L'homodimérisation d'AtSERK1 à la membrane plasmique a été démontrée par des études indépendantes en utilisant les méthodes du FRET, du double-hybride, du PCH (« photon counting histogram ») et du FCS (« fluorescence cross correlation spectroscopy ») (Russeinova et al., 2004; Shah et al., 2001; Hink et al., 2008). Suite au bombardement, son homodimérisation a été confirmée par BiFC dans notre système hétérologue transitoire. De plus, le bombardement résulte en une hétérodimérisation positive entre AtSERK1 et chacune des protéines AtORK11, révélant une interaction inattendue de ces récepteurs (figure 10). Les témoins négatifs usuels employant les fragments non fusionnés de la YFP, tel que

mentionné ci haut, correspondent à la réponse négative attendue pour AtSERK1. Bien que les récepteurs AtSERK1 et AtORK11 soient de taille semblables (4 ou 5 domaines LRR) et qu'il y ait co-expression avec AtORK11a, ils proviennent de familles phylogénétiquement éloignées et, à première vue, aucune évidence concrète ne nous laissait supposer une interaction. Pourtant, le récepteur kinase monomérique BAK1 représente un exemple d'adaptateur ou d'amplificateur de plusieurs voies signalant grâce à des récepteurs kinases différents (Rusinova et al., 2004; Chinchilla et al., 2009). Puisque l'interaction d'AtSERK1 et des récepteurs AtORK11 était improbable mais néanmoins possible, une validation de la spécificité des hétérodimérisations de la famille a été recherchée en utilisant un deuxième gène comme témoin négatif.

Le gène sélectionné comme témoin négatif potentiel du BiFC est un récepteur kinase de la famille LRR X (At1g27190, Shiu et Bleecker, 2001) possédant 4 domaines LRR, donc de taille similaire aux récepteurs AtORK11. Par analyse bioinformatique, Lorenzo et al. ont placé le gène At1g27190 (AtMSrkl2) parmi une famille d'homologues d'un récepteur kinase LRR de *Medicago truncatula*, Srlk, impliqué dans les premiers événements de signalisation en réponse au stress salin (de Lorenzo et al., 2009). Aucune autre information n'est disponible sur ce récepteur. La localisation prédite de la protéine à la membrane plasmique a été confirmée par bombardement de la fusion pMDC83-At1g27190, montrant aussi l'intégrité de cette dernière. Aucune homodimérisation n'a été détectée pour les fusions des fragments YFP avec le gène At1g27190. Une absence de signal n'indique pas

nécessairement une absence d'interaction, car il peut y avoir des contraintes spatiales empêchant la reconstitution du complexe fluorescent ou une altération structurale de la protéine suite à la fusion (Kerppola, 2008). Pourtant, les constructions devraient être fonctionnelles, tel que vérifié par le séquençage de la jonction de fusion et par l'obtention d'un signal pour pMDC83-At1g27190, et puisque les conditions de bombardement pour le BiFC sont identiques aux précédentes interactions testées. La fusion GFP ne porte ni atteinte à l'expression d'At1g27190 ni à sa localisation membranaire, laissant supposer qu'il en est de même pour les fusions YFP. En outre, certains récepteurs LRR n'agissent pas par homodimérisation, tel que le récepteur kinase monomérique FLS2, ou certains sont seulement impliqués comme co-récepteur dans différents complexes oligomériques, tel que le récepteur monomérique BAK1 (Ali et al., 2007; Aker et de Vries, 2008; Chinchilla et al., 2009). Il est donc envisageable que le récepteur At1g27190 n'homodimérise pas à la membrane plasmique, reflétant l'absence de signal pour l'interaction YFP. Conformément à ces arguments, un essai en BiFC entre AtSERK1 et At1g27190 a provoqué un signal fluorescent, indiquant une interaction entre les protéines et assurant l'intégrité des fusions de la YFP et d'At1g27190 (figure 10). Par contre, dans les essais de bombardement entre les récepteurs AtORK11 et le récepteur At1g27190, aucune reconstitution de la fluorescence en YFP n'a été détectée (Figure 10). Ces deux derniers éléments viennent confirmer la spécificité d'interaction entre les récepteurs AtORK11. En effet, selon ces données, le gène AtSERK1 semble être celui qui agit de façon non discriminatoire dans ses interactions protéines-protéines. Même si certaines raisons, telles que les patrons expression

et un rôle au cours du développement, appuient une interaction entre AtSERK1 et les récepteurs AtORK11, il est beaucoup plus difficile de trouver des raisons qui appuient l'interaction d'AtSERK1 avec le récepteur AtMSrkl2 (At1g27190).

Un témoin négatif additionnel avait été tenté en utilisant des constructions en BiFC pour les RLK-LRRs SRF6 et SRF7 (effectuées par Rachid Benhamman). Initialement, l'objectif était de tester l'homodimérisation et l'hétérodimérisation de ces deux récepteurs. J'ai effectué le bombardement sur les cellules d'oignon, sans aucun résultat fluorescent. Bien que les constructions aient été vérifiées par séquençage, d'autres facteurs sont à considérer pour l'absence d'interaction tels que mentionnés précédemment. Cependant, peu importe les raisons d'une absence de fluorescence, les fusions SRF6 et SRF7 ne peuvent pas être utiles pour valider la spécificité d'interactions des récepteurs AtORK11.

### **4.3 Bombardement et localisation cellulaire**

La technique du bombardement en cellules d'oignon a aussi permis l'identification de la localisation du récepteur kinase LRR ScORK28 de *Solanum chacoense*. La fusion GFP de ce gène a été effectuée par Hugo Germain qui l'a testée par agroinfiltration de feuilles de *Nicotiana benthaminana* et dont la localisation à la membrane plasmique a été confirmée entre mes mains (Germain et al., 2007).



La localisation d'une autre protéine étudiée au laboratoire a été démontrée en utilisant la fluorescence. ScFRK1 est une protéine kinase similaire aux MAP3K et identifiée chez *Solanum chacoense* (Gray-Mitsumune et al., 2006). Cette kinase est impliquée dans le développement du sac embryonnaire, de l'embryon et du fruit (Lafleur et al., en préparation). Les MAP kinases constituent un module de trois protéines kinases se phosphorylant spécifiquement en une cascade pour intégrer un signal perçu à la membrane et le transmettre aux facteurs de transcription ou autres enzymes en aval. Typiquement, une MAP3K est activée suite à la perception d'un signal par un intermédiaire tel qu'un récepteur kinase. Elle active ensuite une MAP2K qui elle-même active la MAPK qui sera transportée dans le noyau pour activer des gènes par phosphorylation de facteurs de transcription. La protéine ScFRK1 est similaire mais non identique aux MAP3K. Elle comprend aussi une séquence de localisation nucléaire (NLS) à son extrémité C-terminale, déterminée par bioinformatique (Kapfer, 2003). Le bombardement de la fusion pMDC83-ScFRK1 dans les cellules d'oignon attribue une localisation nucléaire à la protéine. Cette localisation appuie la prédiction informatique, mais contredit le modèle théorique des voies de MAP kinases. Étant donné la similarité avec les MAP3K, la localisation présumée était dans le cytoplasme. Cependant, des localisations nucléaires ont déjà été détectées pour des MAP kinases des plantes, par exemple les protéines MEKK1 chez *Arabidopsis* et NPK1 chez le tabac. Il a été démontré que la MAP3K MEKK1 (aussi connu sous le nom MAPKKK8, At4g08500) se lie au promoteur du facteur de transcription WRKY53, impliqué dans la régulation de la sénescence des feuilles, et interagit avec la protéine

WRKY53 elle-même au noyau (Miao et al., 2007). La MAP3K NPK1 possède un signal de localisation nucléaire et se retrouve au noyau durant l'interphase (Ishikawa et al., 2002). Comme pour ces deux localisations inhabituelles de MAP kinases, la protéine ScFRK1 pourrait se situer au noyau.

Toutefois, la localisation subnucléaire n'a pu être précisée. En effet, la majorité des noyaux fluorescents possèdent un signal GFP diffus, semblable à celui identifié pour d'autres protéines nucléaires. Par exemple, la GFP est cytoplasmique, mais aussi nucléaire (Figure 8e). Les facteurs de transcription SAD, BPBF et GAMYB ont aussi une localisation nucléaire qui semble diffuse, lorsque exprimés dans les cellules d'oignon par bombardement (Diaz et al., 2005). Lors du bombardement, une minorité de noyaux présentent un signal fluorescent nucléaire, mais de type moucheté. Bien qu'une comparaison soit difficile à effectuer, cette fluorescence pourrait ressembler à différentes localisations de type « speckles ». Au noyau, les « speckles » fluorescents peuvent représenter la localisation de la chromatine, des régions reliées à la matrice nucléaire ou les régions de traitement de l'ARN et des complexes d'exportation de l'ARN (Li et al., 2002; Moriguchi et al., 2005; Schmidt et al., 2006). Une meilleure coloration au DAPI ou avec un autre colorant nucléaire, comme l'iodure de propidium, combiné avec une observation au microscope confocal permettrait de mieux détailler cette fluorescence mouchetée de pMDC83-ScFRK1 et de la comparer aux fluorescences décrites. De même, une

caractérisation plus détaillée de la protéine ScFRK1 en elle-même et de ses partenaires d'interaction et de sa voie d'activation sera nécessaire.

## 5. Perspectives d'avenir

Les recherches effectuées sur les gènes fortement similaires de la famille des récepteurs kinases AtORK11 ont soulevé une hypothèse de redondance fonctionnelle. En effet, il y a une absence de phénotype pour les mutants d'insertion ADN-T, plus particulièrement pour le double mutant d'*AtORK11b/AtORK11d*. De plus, l'homodimérisation et l'hétérodimérisation de chaque récepteur ont été démontrées par la technique de complémentation bimoléculaire en fluorescence (BiFC) en utilisant le bombardement de cellules d'oignon. Les interactions se localisent à la membrane plasmique et reconstituent la fluorescence selon toutes les combinaisons possibles en homo- ou hétérodimérisation. Ces observations concernant l'absence de phénotype et l'hétérodimérisation, combinées à celles de précédents auteurs, supportent une hypothèse de redondance fonctionnelle. Toutefois, aucune fonction précise n'a pu être attribuée aux récepteurs AtORK11, de même que la technique du BiFC telle qu'utilisée ici n'a pu déterminer distinctement le mode d'action des récepteurs au niveau d'une préférence d'interaction et d'une activation de la signalisation.

Il serait intéressant de caractériser les ligands des récepteurs kinases AtORK11. Peu d'entre eux sont connus pour les récepteurs des plantes, mais l'information découlant de leur identification est importante et permet plusieurs essais expérimentaux additionnels. La découverte du ligand peut aussi être d'une grande aide dans la caractérisation de la fonction biologique d'une protéine. L'idée émergente semble être que les récepteurs kinases phylogénétiquement proches sont reliés au niveau de leur fonction, par redondance ou par des voies chevauchantes, et qu'ils peuvent se lier à des membres d'une même famille de

ligands peptidiques, le type de ligand le plus courant. Puisque l'hypothèse de redondance fonctionnelle a été soulevée pour les récepteurs AtORK11, l'idée d'une famille de peptides s'y liant serait intéressante à vérifier. L'identification pourrait être faite, par exemple, avec la technique du HaloTag récemment développée pour l'immobilisation covalente des récepteurs sur des billes et le repêchage des ligands (Shinohara et Matsubayashi, 2007). Une autre perspective intéressante serait de caractériser les protéines interagissant avec le domaine kinase de AtORK11a et de AtORK11b (Tarutani et al., 2004b). Il serait bien de vérifier si les récepteurs AtORK11c et AtORK11d sont aussi des partenaires de ces protéines. Ces deux protéines étant encore de nature inconnue, leur caractérisation pourraient aider à disséquer la voie de signalisation des récepteurs AtORK11, définissant ainsi la fonction de ceux-ci.

## Bibliographie

- Afzal, A. J., Wood, A. J. and Lightfoot, D. A.** (2008) Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 507-517.
- Aker, J. and de Vries, S. C.** (2008) Plasma membrane receptor complexes. *Plant physiology* 147: 1560-1564.
- Albrecht, C., Russinova, E., Hecht, V., Baaijens, E. and de Vries, S.** (2005) The *Arabidopsis thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 control male sporogenesis. *The Plant cell* 17: 3337-3349.
- Albrecht, C., Russinova, E., Kemmerling, B., Kwaaitaal, M., de Vries, S.C.** (2008) *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase proteins serve brassinosteroid-dependent and –independent signalling pathways. *Plant Physiology* 148: 611-619.
- Ali, G. S., Prasad, K. V., Day, I. and Reddy, A. S.** (2007) Ligand-dependent reduction in the membrane mobility of FLAGELLIN SENSITIVE2, an *Arabidopsis* receptor-like kinase. *Plant & cell physiology* 48: 1601-1611.
- Alonso, J. M. and Stepanova, A. N.** (2003) T-DNA mutagenesis in *Arabidopsis*. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J 236: 177-188.
- Barrell, P. J. and Grossniklaus, U.** (2005) Confocal microscopy of whole ovules for analysis of reproductive development: the elongate1 mutant affects meiosis II. *Plant J* 43: 309-320.
- Becraft, P.** (1998) Receptor kinases in plant development. *Trends in plant science* 3: 384-388.
- Bella, J., Hindle, K. L., McEwan, P. A. and Lovell, S. C.** (2008) The leucine-rich repeat structure. *Cell Mol Life Sci* 65: 2307-2333.
- Bleuyard, J. Y. and White, C. I.** (2004) The *Arabidopsis* homologue of Xrcc3 plays an essential role in meiosis. *The EMBO journal* 23: 439-449.
- Boissn-Dernier, A., Roy, S., Kritsas, K., Grobei, M.A., Jaciubek, M., Schroeder, J.I., Grossniklaus, U.** (2009) Disruption of the pollen-expressed FERONIA homologs

*ANXUR1* and *ANXUR2* triggers pollen tube discharge. *Development* 136: 3279-3288

- Butenko, M. A., Vie, A. K., Brembu, T., Aalen, R. B. and Bones, A. M.** (2009) Plant peptides in signalling: looking for new partners. *Trends in plant science* 14: 255-263.
- Cabrillac, D., Cock, J. M., Dumas, C. and Gaude, T.** (2001) The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* 410: 220-223.
- Capron, A., Gourgues, M., Neiva, L.S., Faure, J-E., Berger, F., Pagnussat, G., Krishnan, A., Alvarez-Mejia, C., Vielle-Calzada, J-P., Lee, Y-R., Liu, B., Sundaresan, V.** (2008) Maternal control of male-gamete delivery in *Arabidopsis* involves a putative GPI-anchored protein encoded by the *LORELEI* gene. *The Plant Cell* 20: 3038-3049.
- Castle, L. A., Errampalli, D., Atherton, T. L., Franzmann, L. H., Yoon, E. S. and Meinke, D. W.** (1993) Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genet* 241: 504-514.
- Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L. and Lenardo, M. J.** (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288: 2351-2354.
- Chevalier, D. and Walker, J. C.** (2005) Functional genomics of protein kinases in plants. *Briefings in functional genomics & proteomics* 3: 362-371.
- Chinchilla, D., Shan, L., He, P., de Vries, S. and Kemmerling, B.** (2009) One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends in Plant Science* 14(10): 535-541.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J. D., Felix, G. and Boller, T.** (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448: 497-500.

- Cho, S. K., Larue, C. T., Chevalier, D., Wang, H., Jinn, T. L., Zhang, S. and Walker, J. C.** (2008) Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 15629-15634.
- Christensen, C. A., King, E.J., Jordan, J.R., Drews, G.N.** (1997) Megagametogenesis in *Arabidopsis* wild type and the Gf mutant. Sex Plant Reprod 10: 49-64.
- Christensen, C. A., Subramanian, S., Drews, G.N.** (1998) Identification of gametophytic mutations affecting female gametophyte development in *Arabidopsis*. Developmental biology 202: 136-151.
- Clark, S. E., Running, M. P. and Meyerowitz, E. M.** (1993) CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. Development (Cambridge, England) 119: 397-418.
- Colcombet, J., Boisson-Dernier, A., Ros-Palau, R., Vera, C.E., Schroeder, J.I.** (2005) *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinases 1 and 2 are essential for tapetum development and microspore maturation. Plant Cell 17: 3350-3361.
- Couteau, F., Belzile, F., Horlow, C., Grandjean, O., Vezon, D. and Doutriaux, M. P.** (1999) Random chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of a dmc1 mutant of *Arabidopsis*. The Plant cell 11: 1623-1634.
- Curtis, M. D. and Grossniklaus, U.** (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. Plant physiology 133: 462-469.
- Curtis, M. J., Belcram, K., Bollmann, S. R., Tominey, C. M., Hoffman, P. D., Mercier, R. and Hays, J. B.** (2009) Reciprocal chromosome translocation associated with TDNA-insertion mutation in *Arabidopsis*: genetic and cytological analyses of consequences for gametophyte development and for construction of doubly mutant lines. Planta 229: 731-745.
- de la Fuente van Bentem, S. and Hirt, H.** (2009) Protein tyrosine phosphorylation in plants: More abundant than expected? Trends in plant science 14: 71-76.



- de Lorenzo, L., Merchan, F., Laporte, P., Thompson, R., Clarke, J., Sousa, C. and Crespi, M.** (2009) A novel plant leucine-rich repeat receptor kinase regulates the response of *Medicago truncatula* roots to salt stress. *The Plant cell* 21: 668-680.
- Deyoung, B. J. and Clark, S. E.** (2008) BAM receptors regulate stem cell specification and organ development through complex interactions with CLAVATA signaling. *Genetics* 180: 895-904.
- Diaz, I., Martinez, M., Isabel-LaMoneda, I., Rubio-Somoza, I. and Carbonero, P.** (2005) The DOF protein, SAD, interacts with GAMYB in plant nuclei and activates transcription of endosperm-specific genes during barley seed development. *Plant J* 42: 652-662.
- Dievart, A. and Clark, S. E.** (2003) Using mutant alleles to determine the structure and function of leucine-rich repeat receptor-like kinases. *Current opinion in plant biology* 6: 507-516.
- Dunning, F. M., Sun, W., Jansen, K. L., Helft, L. and Bent, A. F.** (2007) Identification and mutational analysis of *Arabidopsis* FLS2 leucine-rich repeat domain residues that contribute to flagellin perception. *The Plant cell* 19: 3297-3313.
- Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C.** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research* 19: 1349.
- Escobar-Restrepo, J. M., Huck, N., Kessler, S., Gagliardini, V., Gheyselinck, J., Yang, W. C. and Grossniklaus, U.** (2007) The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception. *Science (New York, N.Y)* 317: 656-660.
- Ferrandiz, C., Pelaz, S. and Yanofsky, M. F.** (1999) Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annu Rev Biochem* 68: 321-354.
- Forsbach, A., Schubert, D., Lechtenberg, B., Gils, M. and Schmidt, R.** (2003) A comprehensive characterization of single-copy T-DNA insertions in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant molecular biology* 52: 161-176.

- Germain, H., Houde, J., Gray-Mitsumune, M., Sawasaki, T., Endo, Y., Rivoal, J. and Matton, D. P.** (2007) Characterization of ScORK28, a transmembrane functional protein receptor kinase predominantly expressed in ovaries from the wild potato species *Solanum chacoense*. *FEBS letters* 581: 5137-5142.
- Germain, H., Rudd, S., Zotti, C., Caron, S., O'Brien, M., Chantha, S. C., Lagace, M., Major, F. and Matton, D. P.** (2005) A 6374 unigene set corresponding to low abundance transcripts expressed following fertilization in *Solanum chacoense* Bitt, and characterization of 30 receptor-like kinases. *Plant molecular biology* 59: 515-532.
- Gomez-Gomez, L. and Boller, T.** (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular cell* 5: 1003-1011.
- Gray-Mitsumune, M., O'Brien, M., Bertrand, C., Tebbji, F., Nantel, A. and Matton, D. P.** (2006) Loss of ovule identity induced by overexpression of the fertilization-related kinase 2 (ScFRK2), a MAPKKK from *Solanum chacoense*. *Journal of experimental botany* 57: 4171-4187.
- Grinberg, A. V., Hu, C. D. and Kerppola, T. K.** (2004) Visualization of Myc/Max/Mad family dimers and the competition for dimerization in living cells. *Molecular and cellular biology* 24: 4294-4308.
- Haffani, Y. Z., Silva, N.F., Goring, D.R.** (2004) Receptor kinase signalling in plants. *Can. J. Bot.* 82: 1-15.
- Hecht, V., Vielle-Cazada, J.P., Hartog, M.V., Schmidt, E.D.L., Boutilier, K., Grossniklaus, U., de Vries, S.C.** (2001) The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology* 127: 803-816.
- Heese, A., Hann, D. R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A. M., He, K., Li, J., Schroeder, J. I., Peck, S. C. and Rathjen, J. P.** (2007) The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is

a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 12217-12222.

- Hink, M. A., Shah, K., Russinova, E., de Vries, S. C. and Visser, A. J.** (2008) Fluorescence fluctuation analysis of *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor-like kinase and brassinosteroid insensitive 1 receptor oligomerization. *Biophysical journal* 94: 1052-1062.
- Hord, C. L., Chen, C., Deyoung, B. J., Clark, S. E. and Ma, H.** (2006) The BAM1/BAM2 receptor-like kinases are important regulators of *Arabidopsis* early anther development. *The Plant cell* 18: 1667-1680.
- Hu, C. D., Chinenov, Y. and Kerppola, T. K.** (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular cell* 9: 789-798.
- Hu, C. D. and Kerppola, T. K.** (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature biotechnology* 21: 539-545.
- Huck, N., Moore, J. M., Federer, M. and Grossniklaus, U.** (2003) The *Arabidopsis* mutant *feronia* disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception. *Development (Cambridge, England)* 130: 2149-2159.
- Ishikawa, M., Soyano, T., Nishihama, R. and Machida, Y.** (2002) The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase contains a functional nuclear localization signal at the binding site for the NACK1 kinesin-like protein. *Plant J* 32: 789-798.
- Jinn, T. L., Stone, J. M. and Walker, J. C.** (2000) HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes & development* 14: 108-117.
- Kakita, M., Murase, K., Iwano, M., Matsumoto, T., Watanabe, M., Shiba, H., Isogai, A. and Takayama, S.** (2007) Two distinct forms of M-locus protein kinase localize to the plasma membrane and interact directly with S-locus receptor kinase to

transduce self-incompatibility signaling in *Brassica rapa*. *The Plant cell* 19: 3961-3973.

- Kapfer, C.** (2004) Caractérisation du rôle de la protéine kinase PRK1 dans la reproduction chez *Solanum chacoense* M. Sc. Université de Montréal, Montréal.
- Karlova, R., Boeren, S., Russinova, E., Aker, J., Vervoot, J., de Vries, S.C.** (2006) The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor-like kinase1 protein complex includes brassinosteroid-insensitive1. *Plant Cell* 18: 625-638.
- Karlova, R., Boeren, S., van Dongen, W., Kwaaitaal, M., Aker, J., Vervoort, J. and de Vries, S.** (2009) Identification of in vitro phosphorylation sites in the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor-like kinases. *Proteomics* 9: 368-379.
- Kerppola, T. K.** (2006) Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nature protocols* 1: 1278-1286.
- Kerppola, T. K.** (2008) Bimolecular fluorescence complementation: visualization of molecular interactions in living cells. *Methods in cell biology* 85: 431-470.
- Kinoshita, T., Cano-Delgado, A., Seto, H., Hiranuma, S., Fujioka, S., Yoshida, S. and Chory, J.** (2005) Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature* 433: 167-171.
- Kobe, B. and Deisenhofer, J.** (1994) The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends in biochemical sciences* 19: 415-421.
- Kobe, B. and Kajava, A. V.** (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current opinion in structural biology* 11: 725-732.
- Krysan, P. J., Young, J. C. and Sussman, M. R.** (1999) T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 11: 2283-2290.
- Lacroix, B., Vaidya, M., Tzfira, T. and Citovsky, V.** (2005) The VirE3 protein of *Agrobacterium* mimics a host cell function required for plant genetic transformation. *The EMBO journal* 24: 428-437.

- Lafleur, E.** (2009) Rôle de la protéine ScFRK1 dans le développement du sac embryonnaire et son impact sur le guidage des tubes polliniques M. Sc. Université de Montréal, Montréal.
- Lalonde, S., Ehrhardt, D. W., Loque, D., Chen, J., Rhee, S. Y. and Frommer, W. B.** (2008) Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions: latest techniques and current limitations. *Plant J* 53: 610-635.
- Li, J. and Chory, J.** (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90: 929-938.
- Li, J. and Jin, H.** (2007) Regulation of brassinosteroid signaling. *Trends in plant science* 12: 37-41.
- Li, J., Wen, J., Lease, K. A., Doke, J. T., Tax, F. E. and Walker, J. C.** (2002) BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* 110: 213-222.
- Liu, J., Qu, L.-J.** (2008) Meiotic and mitotic cell cycle mutants involved in gametophyte development in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 1: 564-574.
- Magliery, T. J., Wilson, C. G., Pan, W., Mishler, D., Ghosh, I., Hamilton, A. D. and Regan, L.** (2005) Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism. *Journal of the American Chemical Society* 127: 146-157.
- Matsubayashi, Y.** (2003) Ligand-receptor pairs in plant peptide signaling. *Journal of cell science* 116: 3863-3870.
- Matsubayashi, Y. and Sakagami, Y.** (2000) 120- and 160-kDa receptors for endogenous mitogenic peptide, phytosulfokine- $\alpha$ , in rice plasma membranes. *The Journal of biological chemistry* 275: 15520-15525.
- Miao, Y., Laun, T. M., Smykowski, A. and Zentgraf, U.** (2007) *Arabidopsis* MEKK1 can take a short cut: it can directly interact with senescence-related WRKY53 transcription factor on the protein level and can bind to its promoter. *Plant molecular biology* 65: 63-76.

- Miernyk, J. A. and Thelen, J. J.** (2008) Biochemical approaches for discovering protein-protein interactions. *Plant J* 53: 597-609.
- Miwa, H., Betsuyaku, S., Iwamoto, K., Kinoshita, A., Fukuda, H. and Sawa, S.** (2008) The receptor-like kinase SOL2 mediates CLE signaling in Arabidopsis. *Plant & cell physiology* 49: 1752-1757.
- Miyazaki, S., Murata, T., Sakurai-Ozato, N., Kubo, M., Demura, T., Fukuda, H., Hasebe, M.** (2009) *Anxur1* and 2, sister genes to *FERONIA/SIRENE*, are male factors for coordinated fertilization. *Current Biology* 19: 1327-1331.
- Mizuno, S., Osakabe, Y., Maruyama, K., Ito, T., Osakabe, K., Sato, T., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2007) Receptor-like protein kinase 2 (RPK 2) is a novel factor controlling anther development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 50: 751-766.
- Mori, T., Kuroiwa, H., Higashiyama, T. and Kuroiwa, T.** (2006) GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization. *Nature cell biology* 8: 64-71.
- Moriguchi, K., Suzuki, T., Ito, Y., Yamazaki, Y., Niwa, Y. and Kurata, N.** (2005) Functional isolation of novel nuclear proteins showing a variety of subnuclear localizations. *The Plant cell* 17: 389-403.
- Morsy, M., Gouthu, S., Orchard, S., Thorneycroft, D., Harper, J. F., Mittler, R. and Cushman, J. C.** (2008) Charting plant interactomes: possibilities and challenges. *Trends in plant science* 13: 183-191.
- Mu, J. H., Lee, H. S. and Kao, T. H.** (1994) Characterization of a pollen-expressed receptor-like kinase gene of *Petunia inflata* and the activity of its encoded kinase. *The Plant cell* 6: 709-721.
- Muller, R., Bleckmann, A. and Simon, R.** (2008) The receptor kinase CORYNE of *Arabidopsis* transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. *The Plant cell* 20: 934-946.

- Nacry, P., Camilleri, C., Courtial, B., Caboche, M. and Bouchez, D.** (1998) Major chromosomal rearrangements induced by T-DNA transformation in *Arabidopsis*. *Genetics* 149: 641-650.
- Naithani, S., Chookajorn, T., Ripoll, D. R. and Nasrallah, J. B.** (2007) Structural modules for receptor dimerization in the S-locus receptor kinase extracellular domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 12211-12216.
- Nam, K. H. and Li, J.** (2002) BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* 110: 203-212.
- Nishimura, R., Hayashi, M., Wu, G. J., Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Murakami, Y., Kawasaki, S., Akao, S., Ohmori, M., Nagasawa, M., Harada, K. and Kawaguchi, M.** (2002) HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature* 420: 426-429.
- Obrdlik, P., El-Bakkoury, M., Hamacher, T., Cappellaro, C., Vilarino, C., Fleischer, C., Ellerbrok, H., Kamuzinzi, R., Ledent, V., Blaudez, D., Sanders, D., Revuelta, J. L., Boles, E., Andre, B. and Frommer, W. B.** (2004) K<sup>+</sup> channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 12242-12247.
- Oh, M. H., Ray, W. K., Huber, S. C., Asara, J. M., Gage, D. A. and Clouse, S. D.** (2000) Recombinant brassinosteroid insensitive 1 receptor-like kinase autophosphorylates on serine and threonine residues and phosphorylates a conserved peptide motif in vitro. *Plant physiology* 124: 751-766.
- Oh, M. H., Wang, X., Kota, U., Goshe, M. B., Clouse, S. D. and Huber, S. C.** (2009) Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase emerges as a component of brassinosteroid signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 658-663.

- Oparka, K. J.** (1994) Plasmolysis: new insights into an old process. *New Phytol.* 126: 571-591.
- Russinova, E., Borst, J. W., Kwaaitaal, M., Cano-Delgado, A., Yin, Y., Chory, J. and de Vries, S. C.** (2004) Heterodimerization and endocytosis of *Arabidopsis* brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *The Plant cell* 16: 3216-3229.
- Sambrook, F., Maniatis** (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, États-Unis.
- Scheer, J. M. and Ryan, C. A., Jr.** (2002) The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 9585-9590.
- Schmidt, U., Richter, K., Berger, A. B. and Lichter, P.** (2006) In vivo BiFC analysis of Y14 and NXF1 mRNA export complexes: preferential localization within and around SC35 domains. *The Journal of cell biology* 172: 373-381.
- Schommer, C., Beven, A., Lawrenson, T., Shaw, P. and Sablowski, R.** (2003) AHP2 is required for bivalent formation and for segregation of homologous chromosomes in *Arabidopsis* meiosis. *Plant J* 36: 1-11.
- Shah, K., Gadella Jr, T.W.J., van Erp, H., Hecht, V., de Vries, S.C.** (2001) Subcellular localization and oligomerization of the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1 protein. *J. Mol. Biol.* 309: 641-655.
- Shahollari, B., Peskan-Berghöfer, T., Oelmüller, R.** (2004) Receptor kinases with leucine-rich repeats are enriched in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains from plants. *Physiologia Plantarum* 122: 397-403.
- Shinohara, H. and Matsubayashi, Y.** (2007) Functional immobilization of plant receptor-like kinase onto microbeads towards receptor array construction and receptor-based ligand fishing. *Plant J* 52: 175-184.



- Shiu, S. H. and Bleecker, A. B.** (2001) Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 10763-10768.
- Shiu, S. H. and Bleecker, A. B.** (2003) Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 132: 530-543.
- Shpak, E. D., Berthiaume, C. T., Hill, E. J. and Torii, K. U.** (2004) Synergistic interaction of three ERECTA-family receptor-like kinases controls *Arabidopsis* organ growth and flower development by promoting cell proliferation. *Development (Cambridge, England)* 131: 1491-1501.
- Shpak, E. D., Lakeman, M. B. and Torii, K. U.** (2003) Dominant-negative receptor uncovers redundancy in the *Arabidopsis* ERECTA Leucine-rich repeat receptor-like kinase signaling pathway that regulates organ shape. *The Plant cell* 15: 1095-1110.
- Stenvik, G. E., Tandstad, N. M., Guo, Y., Shi, C. L., Kristiansen, W., Holmgren, A., Clark, S. E., Aalen, R. B. and Butenko, M. A.** (2008) The EPIP peptide of INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION is sufficient to induce abscission in *Arabidopsis* through the receptor-like kinases HAESA and HAESA-LIKE2. *The Plant cell* 20: 1805-1817.
- Stevens, R., Grelon, M., Vezon, D., Oh, J., Meyer, P., Perennes, C., Domenichini, S., Bergounioux, C.** (2004) A CDC45 homolog in *Arabidopsis* is essential for meiosis, as shown by RNA interference-induced gene silencing. *The Plant cell* 16: 99-113.
- Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A. and Hinata, K.** (2000) The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature* 403: 913-916.
- Takayama, S., Shimosato, H., Shiba, H., Funato, M., Che, F. S., Watanabe, M., Iwano, M. and Isogai, A.** (2001) Direct ligand-receptor complex interaction controls *Brassica* self-incompatibility. *Nature* 413: 534-538.
- Tao, R. H. and Maruyama, I. N.** (2008) All EGF(ErbB) receptors have preformed homo- and heterodimeric structures in living cells. *Journal of cell science* 121: 3207-3217.

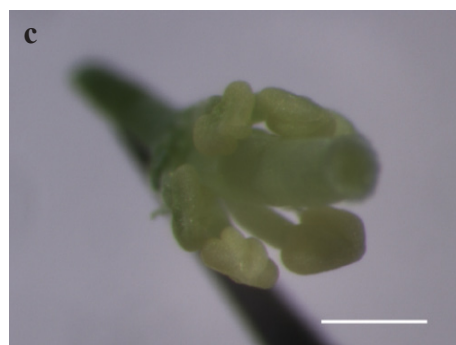
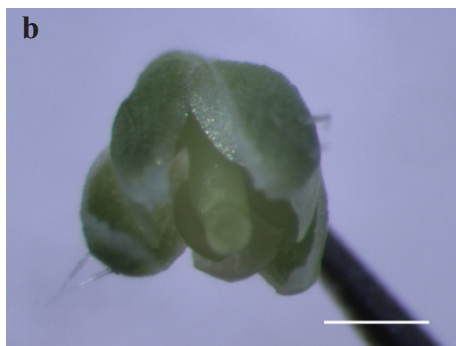
- Tarutani, Y., Morimoto, T., Sasaki, A., Yasuda, M., Nakashita, H., Yoshida, S., Yamaguchi, I. and Suzuki, Y.** (2004) Molecular characterization of two highly homologous receptor-like kinase genes, RLK902 and RKL1, in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 68: 1935-1941.
- Tarutani, Y., Sasaki, A., Yasuda, M., Nakashita, H., Yoshida, S., Yamaguchi, I. and Suzuki, Y.** (2004) Identification of three clones which commonly interact with the kinase domains of highly homologous two receptor-like kinases, RLK902 and RKL1. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 68: 2581-2587.
- ten Dijke, P. and Hill, C. S.** (2004) New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends in biochemical sciences* 29: 265-273.
- Torii, K. U.** (2004) Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *Int Rev Cytol* 234: 1-46.
- Trotochaud, A. E., Hao, T., Wu, G., Yang, Z. and Clark, S. E.** (1999) The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. *The Plant cell* 11: 393-406.
- Ullrich, A. and Schlessinger, J.** (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61: 203-212.
- van Zanten, M., Snoek, L. B., Proveniers, M. C. and Peeters, A. J.** (2009) The many functions of ERECTA. *Trends in plant science* 14: 214-218.
- Walker, J. C.** (1994) Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant molecular biology* 26: 1599-1609.
- Walter, M., Chaban, C., Schutze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Nake, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K. and Kudla, J.** (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* 40: 428-438.
- Wang, X., Goshe, M. B., Soderblom, E. J., Phinney, B. S., Kuchar, J. A., Li, J., Asami, T., Yoshida, S., Huber, S. C. and Clouse, S. D.** (2005) Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the *Arabidopsis*

- BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase. *The Plant cell* 17: 1685-1703.
- Waterhouse, P. M. and Helliwell, C. A.** (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature reviews* 4: 29-38.
- Weinthal, D., Tzfira, T.** (2009) Imaging protein-protein interactions in plant cells by bimolecular fluorescence complementation assay. *Trends in plant science* 14: 59-63.
- Xia, Y., Lu, L. J. and Gerstein, M.** (2006) Integrated prediction of the helical membrane protein interactome in yeast. *Journal of molecular biology* 357: 339-349.
- Xu, X., Soutto, M., Xie, Q., Servick, S., Subramanian, C., von Arnim, A. G. and Johnson, C. H.** (2007) Imaging protein interactions with bioluminescence resonance energy transfer (BRET) in plant and mammalian cells and tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 10264-10269.
- Yamaguchi, Y., Pearce, G. and Ryan, C. A.** (2006) The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 10104-10109.
- Yun, H. S., Bae, Y. H., Lee, Y. J., Chang, S. C., Kim, S. K., Li, J. and Nam, K. H.** (2009) Analysis of phosphorylation of the BRI1/BAK1 complex in *Arabidopsis* reveals amino acid residues critical for receptor formation and activation of BR signaling. *Molecules and cells* 27: 183-190.
- Zappel, N. F. and Panstruga, R.** (2008) Heterogeneity and lateral compartmentalization of plant plasma membranes. *Current opinion in plant biology* 11: 632-640.
- Zhang, R. and Walker, J.C.** (1990) Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-Locus glycoproteins of Brassica. *Nature* 345: 743-746.
- Zhou, J., Loh, Y. T., Bressan, R. A. and Martin, G. B.** (1995) The tomato gene Pti1 encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response. *Cell* 83: 925-935.

## Annexe 1

### Méthode de croisement d'*Arabidopsis thaliana*

#### A. Émasculation



1. L'émasculation doit se faire **tôt le matin**, préférablement avant 11 h, pour respecter le cycle des plantes.

2. Sélectionner les fleurs avec des sépales bien visibles et l'extrémité blanchie, sans que les pétales ne soient sortis (figure **a**; fleurs avec des astérisques).

3. Enlever les fleurs plus jeunes et les fleurs plus vieilles, mais celles qui ont des siliques en développement peuvent être laissées pour **minimiser les dommages** infligés à la plante. Identifier l'inflorescence avec une petite étiquette.

4. Sous le binoculaire, prendre **délicatement** une fleur à émasculer entre les doigts et, en utilisant des pinces microscopiques (de type FST No.11252-00), retirer délicatement les **6** anthères en écartant les sépales et pétales au niveau de leurs pointes supérieures, de façon à accéder aux anthères par le haut (figure **b**). Il faut absolument conserver les pétales et les sépales sur la fleur.

Attentions particulières pour l'émasculation:

\* **Réduire au maximum le contact** des pinces avec les pétales, sépales et surtout avec le pistil, pour ne pas les endommager, au risque de tuer la fleur.

\* Si des grains de pollen sont libérés quand l'anthère est arrachée, la fleur était trop vieille. Il vaut mieux en choisir une plus jeune.

**Figure 1-** Photographies de fleurs d'*Arabidopsis thaliana* prises au binoculaire  
**a.** Inflorescence complète; les fleurs prêtes pour l'émasculation sont marquées d'un astérisque  
**b.** Les anthères sont retirées en écartant les sépales à leur extrémité  
**c.** Fleur disséquée pour montrer la disposition des anthères autour du pistil; notez la position en retrait de deux des six anthères. Barre d'échelle **a.** 1 mm **b,c.** 0,5 mm

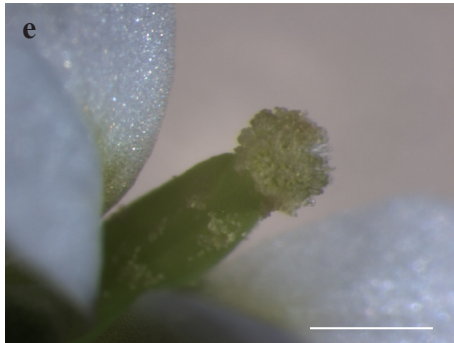
## B. Pollinisation



5. La pollinisation des fleurs préparées se fait **48 heures** après l'émasculation.

6. La pollinisation se fait tôt le matin, préférablement à la même heure que l'émasculation.

7. Sous le binoculaire, la fleur émasculée aura des pétales ouverts et un stigmate proéminent avec des papilles stigmatiques réceptives (figure **d**).



8. Sous le binoculaire, prendre délicatement une fleur émasculée entre les doigts et y frotter **douce-ment** une fleur à l'**anthèse** de l'autre génotype. Les fleurs à l'anthèse se reconnaissent par des pétales sortis et ouverts, de même que du pollen facilement détachable des anthères.

9. Le stigmate de la fleur pollinisée devrait être recouvert de pollen (figure **e**).



10. L'inflorescence croisée doit être bien identifiée et la fleur pollinisée bien distincte des autres fleurs laissées sur la tige (figure **f**).

**Figure 1 (suite)**- Photographies de fleurs d'*Arabidopsis thaliana* prises au binoculaire **d.** Fleur émasculée, 48 heures plus tard **e.** Fleur pollinisée montrant le pollen déposé sur le stigmate **f.** Inflorescence étiquetée, la fleur croisée se repère facilement, étant située à l'extrémité de la tige. Barre d'échelle **d,e.** 0,5 mm **f.** 2 mm

## Annexe 2

### Protocole – Bombardement de microparticules de tungstène

Dernières modifications septembre 2009

#### A. Préparation des microparticules de tungstène

1. Peser 60 mg de microparticules de tungstène (Tungsten M-17 Microcarriers, no. 165-2267 Biorad).
2. Ajouter 1 ml d'ETOH 70 %.
3. Vortexer vigoureusement pendant 5 min., ou encore, utiliser un sonicator.
4. Incuber 15 min. à la température pièce.
5. Centrifuger 2 sec.
6. Enlever l'ETOH.
7. Remplacer par de l'eau distillée, centrifuger 2 sec., enlever le surnageant. Répéter deux fois.
8. Resuspendre dans 1 ml de glycérol 50 % stérile.

Les particules peuvent être gardées dans le glycérol 50 % jusqu'à deux semaines à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Elles permettent de faire une quarantaine de bombardements, mais les quantités de la préparation peuvent être ajustées conséquemment.

#### B. Préparation des particules recouvertes de l'ADN

1. Utiliser entre 5  $\mu\text{g}$  et 10  $\mu\text{g}$  d'ADN par bombardement, selon la taille du plasmide et autres considérations spécifiques au bombardement. Utiliser le plus petit volume d'ADN possible. Si nécessaire, précipiter l'ADN et resuspendre dans une solution de TE pH 8,0 à 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .
2. Vortexer vigoureusement les particules de tungstène préparées pour resuspendre complètement et pipeter 25  $\mu\text{l}$  dans un eppendorf.
3. Ajouter l'ADN, vortexer immédiatement.
4. Ajouter 25  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  2,5 M, vortexer immédiatement.
5. Ajouter 10  $\mu\text{l}$  de spermidine 0,1 M, vortexer immédiatement.  
*Si vous avez plus d'un échantillon, faire l'étape 3 pour tous les tubes, vortexer, puis passer à l'étape 4, vortexer, etc.*
6. Vortexer vigoureusement pendant 5 minutes.
7. Centrifuger 2 sec., enlever le surnageant (le tungstène précipite facilement).
8. Ajouter 500  $\mu\text{l}$  d'ETOH 70 %, vortexer.
9. Centrifuger 2 sec., enlever le surnageant.
10. Répéter 8 et 9 avec de l'ETOH 100 %.
11. Resuspendre les particules recouvertes dans 2 à 10  $\mu\text{l}$  d'ETOH 100 %.

Il est possible de préparer plus d'un échantillon de tungstène recouvert du même ADN dans le même tube, pour faciliter les étapes de vortex. À ce moment, multiplier toute les quantité par le nombre d'échantillons.

*Pour l'oignon :*

*Quantité d'ADN : 7 µg/bombardement, pour un plasmide ~3 kb*

*Resuspension finale dans 4 µl d'ETOH 100 %*

### C. Préparation de l'échantillon à bombarder (épiderme d'oignon)

1. Utiliser un oignon jaune.
2. Détacher l'épiderme intérieur d'une des pelures avec des pinces, couper un carré de 3 cm par 3 cm.
3. Déposer sur un pétris \_ MS. Laisser reposer environ 1 heure ou moins dans le noir, à la température pièce et dans un sac hermétique, avant le bombardement.
4. Une fois le bombardement effectué (étape D), laisser reposer l'épiderme d'oignon sur le pétris pendant 20 à 24 heures, dans le noir, à la température pièce et dans le sac avant l'observation au microscope. Les échantillons peuvent être conservés plus longtemps, mais il y a un risque de contamination.
5. Pour l'observation microscopique de la plasmolyse des cellules: laisser tremper l'épiderme pendant 15 minutes dans une solution 0,8 M saccharose.

### D. Bombardement

Appareil à bombardement, dans la salle de microscopie du laboratoire d'Anja Geitman :



Légende :

1. Cadrons de réglage pour la pression du bombardement, reliés à la bonbonne d'hélium. Utiliser le cadran de gauche pour régler la pression
2. Pompe à vide
3. Levier pour mettre la chambre à bombardement sous vide
4. Détonateur
5. Chambre à bombardement
6. Support pour l'échantillon de tungstène
  - a. Joint en plastique

- b. Disque troué
- c. Support de métal
- 7. Grillage de métal pour disperser l'échantillon bombardé, niveau réglable
- 8. Cible où déposer l'échantillon à bombarder, niveau en hauteur réglable

Protocole :

1. Ouvrir la valve de la bonbonne d'hélium et ajuster la pression à la valeur désirée avec la deuxième valve. Il peut être nécessaire d'activer le détonateur quelques fois pour que la pression indiquée soit la bonne.
2. Ajuster le détonateur situé sur la boîte à bombardement aux paramètres désirés, principalement le temps d'ouverture.
3. Retirer puis nettoyer à l'ETOH le support pour les billes de tungstène; le support de métal et le disque troué.
4. Nettoyer aussi le grillage de métal et placer au niveau désiré. Les niveaux sont numérotés sur le côté intérieur de la chambre à bombardement.
5. Resuspendre complètement l'échantillon de billes de tungstène recouvertes de l'ADN en vortexant vigoureusement. Pipeter la quantité choisie (2-20 $\mu$ l) et déposer au centre du disque troué placé dans le support.
6. Replacer le support dans la chambre et placer l'échantillon à bombarder au niveau désiré, sur la cible.
7. Fermer la porte. Abaisser le levier sur le côté gauche de la chambre et démarrer la pompe. Le vide se crée dans la boîte à bombardement.
8. Avec une légère pression sur la commande du détonateur, bombarder l'échantillon (le mouvement est similaire à celui d'ouvrir et fermer rapidement un interrupteur).
9. Relever le levier pour CASSER LE VIDE, AVANT de fermer la pompe ou d'ouvrir la porte.  
 \*\*Cette étape est cruciale; si la porte est ouverte quand la chambre à bombardement est encore sous vide, l'huile de la pompe se retrouvera dans la chambre et devra être nettoyée\*\*
10. Ouvrir la porte et retirer l'échantillon et le support. Effectuer autant de bombardements que désirés, en nettoyant le support à l'ETOH entre des échantillons d'ADN différents.
11. Fermer la bonbonne d'hélium une fois terminé. Bien nettoyer la boîte à bombardement et faire tremper le support dans l'eau de Javel pendant 10 min. puis rincer abondamment avec de l'eau distillée.

*Paramètres pour l'oignon :*

*Position du grillage de métal : 1*

*Position de l'échantillon : 5*

*Pression : 600 psi*

*Temps d'ouverture du détonateur : 0,05 s*

*Volume bombardé de la préparation des billes : 2  $\mu$ l*

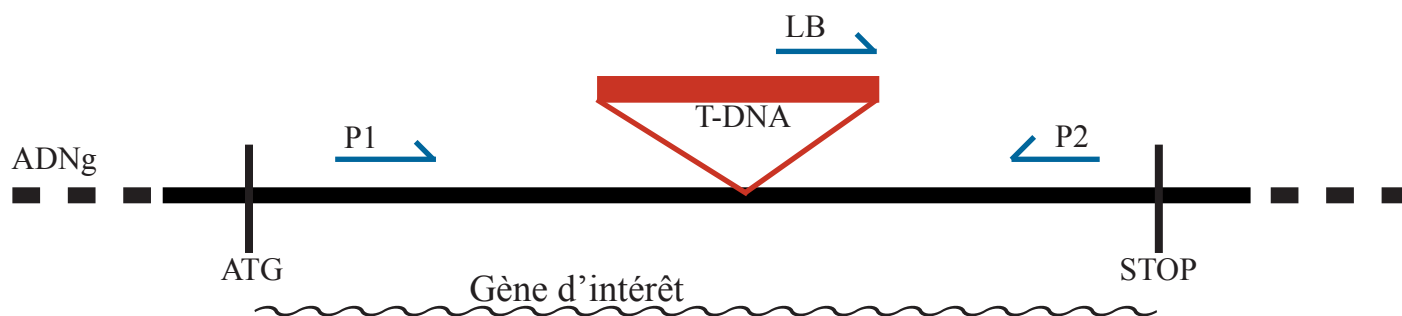


### Annexe 3

Décompte du nombre de graines par silique pour cinq plants indépendants des doubles mutants T-DNA homozygotes et du contrôle de type sauvage (Wt). Le classement des siliques (6<sup>e</sup>, 7<sup>e</sup> et 8<sup>e</sup>) fait référence à leur position sur la tige principale, du bas vers le haut. Le nombre de tiges pour chaque plant et le nombre d'embranchements de la tige principale sont notés.

Lignée	Nombre de graines par silique			Moyenne	Nbre de tiges / embranchements
	6e silique	7e silique	8e silique		
Wt	52	57	64	58 ± 3	1/1
	58	61	59		1/2
	54	56	55		1/1
	57	60	53		3/1
	63	60	62		2/1
094 <sup>-</sup> /840 <sup>-</sup>	66	55	55	55 ± 4	1/1
	50	59	55		1/1
	62	59	42		2/1
	60	50	54		1/1
	52	51	50		2/1
840 <sup>-</sup> /366 <sup>-</sup>	57	61	54	58 ± 2	3/1
	58	62	61		2/1
	61	57	59		1/1
	62	58	59		2/1
	58	53	55		1/1
366 <sup>-</sup> /094 <sup>-</sup>	60	52	60	58 ± 2	1/1
	54	58	58		2/1
	57	57	58		2/1
	56	60	58		1/1
	58	62	59		1/1
B09 <sup>-</sup> /366 <sup>-</sup>	55	58	63	57 ± 3	1/1
	59	62	57		2/1
	61	49	63		1/1
	57	54	54		1/1
	54	52	56		2/1
094 <sup>-</sup> /B09 <sup>-</sup>	52	60	56	58 ± 2	1/1
	58	62	56		1/1
	55	58	58		3/1
	63	58	60		2/1
	60	55	58		1/1
B09 <sup>-</sup> /840 <sup>-</sup>	58	62	57	58 ± 4	2/1
	67	63	59		2/1
	47	48	56		1/1
	54	64	56		1/1
	62	61	60		1/1

## Annexe 4



### Annexe 4- Schématisation des amorces utilisées pour la vérification des insertions T-DNA par criblage PCR.

Les amorces utilisées sont spécifiques au gène d'intérêt à vérifier, soit P1 et P2, tandis que l'amorce spécifique au fragment du T-DNA est LB.

Dans un plant de type sauvage, la combinaison P1P2 produit une amplification par PCR d'une portion du gène de taille connue, tandis que la combinaison P2LB ne produit aucun fragment puisque que l'insertion T-DNA est absente. Dans un plant mutant, la combinaison P1P2 ne produit pas de fragment après amplification par PCR, car l'insertion T-DNA est de taille trop grande pour permettre l'amplification. Dans un plant mutant, la combinaison P2LB produira toutefois un fragment après amplification.

## Annexe 5

Tableau résumé des expériences de BiFC effectuées pour les interactions de la famille de gènes *AtORK11*. Description de la combinaison testée (fusion pUC-SPYNE/fusion pUC-SPYCE) et du résultat obtenu (signal YFP) par obtention d'un signal fluorescent ou non suite au co-bombardement de cellules d'oignon.

<b>Fusion pUC-SPYNE</b>	<b>Fusion pUC-SPYCE</b>	<b>Forme du dimère</b>	<b>Signal YFP</b>	<b>Localisation du signal</b>
NYFP seulement	CYFP seulement	-	-	-
AtORK11a-NYFP	-	-	-	-
AtORK11a-NYFP	CYFP seulement	-	-	-
NYFP seulement	AtORK11a-CYFP	-	-	-
-	AtORK11b-CYFP	-	-	-
NYFP seulement	AtORK11b-CYFP	-	-	-
NYFP seulement	AtORK11c-CYFP	-	-	-
-	AtORK11c-CYFP	-	-	-
-	AtORK11d-CYFP	-	-	-
NYFP only	AtORK11d-CYFP	-	-	-
AtORK11a-NYFP	AtORK11a-CYFP	homo	+	membrane plasmique
AtORK11a-NYFP	AtORK11b-CYFP	hetero	+	membrane plasmique
AtORK11a-NYFP	AtORK11c-CYFP	hetero	+	membrane plasmique
AtORK11a-NYFP	AtORK11d-CYFP	hetero	+	membrane plasmique
AtORK11b-NYFP	AtORK11a-CYFP	hetero	+	membrane plasmique
AtORK11b-NYFP	AtORK11b-CYFP	homo	+	membrane plasmique
AtORK11b-NYFP	AtORK11c-CYFP	hetero	+	membrane plasmique
AtORK11b-NYFP	AtORK11d-CYFP	hetero	+	membrane plasmique
AtORK11c-NYFP	AtORK11a-CYFP	hetero	+	membrane plasmique
AtORK11c-NYFP	AtORK11b-CYFP	hetero	+	membrane plasmique
AtORK11c-NYFP	AtORK11c-CYFP	homo	+	membrane plasmique
AtORK11c-NYFP	AtORK11d-CYFP	hetero	+	membrane plasmique
AtORK11d-NYFP	AtORK11a-CYFP	hetero	+	membrane plasmique
AtORK11d-NYFP	AtORK11b-CYFP	hetero	+	membrane plasmique
AtORK11d-NYFP	AtORK11c-CYFP	hetero	+	membrane plasmique
AtORK11d-NYFP	AtORK11d-CYFP	homo	+	membrane plasmique

Résumé des expériences de BiFC effectuées pour les interactions entre la famille de gènes *AtORK11* et les gènes témoins étudiés. Description de la combinaison testée (fusion pUC-SPYNE/fusion pUC-SPYCE) et du résultat obtenu (signal YFP) par obtention d'un signal fluorescent ou non suite au co-bombardement de cellules d'oignon.

<b>Fusion pUC-SPYNE</b>	<b>Fusion pUC-SPYCE</b>	<b>Forme du dimère</b>	<b>Signal YFP</b>	<b>Localisation du signal</b>
bZIP63-NYFP	CYFP seulement	-	-	-
NYFP seulement	bZIP63-CYFP	-	-	-
bZIP63-NYFP	bZIP63-CYFP	homo	+	nucleus
Atlg27190-NYFP	Atlg27190-CYFP	homo	-	-
Atlg27190-NYFP	AtSERK1-CYFP	hetero	+	membrane plasmique
Atlg27190-NYFP	AtORK11a-CYFP	hetero	-	-
AtORK11a-NYFP	Atlg27190-CYFP	hetero	-	-
Atlg27190-NYFP	AtORK11b-CYFP	hetero	-	-
Atlg27190-NYFP	AtORK11c-CYFP	hetero	-	-
AtORK11c-NYFP	Atlg27190-CYFP	hetero	-	-
AtORK11d-NYFP	Atlg27190-CYFP	hetero	-	-
NYFP seulement	AtSERK1-CYFP	-	-	-
AtSERK1-NYFP	-	-	-	-
AtSERK1-NYFP	AtSERK1-CYFP	homo	+	membrane plasmique
AtSERK1-NYFP	AtORK11a-CYFP	hetero	+	membrane plasmique
AtORK11a-NYFP	AtSERK1-CYFP	hetero	+	membrane plasmique
AtSERK1-NYFP	AtORK11b-CYFP	hetero	+	membrane plasmique
AtORK11c-NYFP	AtSERK1-CYFP	hetero	+	membrane plasmique
AtSERK1-NYFP	AtORK11d-CYFP	hetero	+	membrane plasmique
AtSERK1-NYFP	Atlg27190-CYFP	hetero	+	membrane plasmique